

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



PRODUCCIÓN DE DNA EXTRACELULAR EN UNA ESTIRPE NATURAL DE *Bacillus subtilis*

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Ciencias

María Lamprecht Grandío

DIRECTOR DE TESIS:

José Eduardo González Pastor

Madrid, 2012



CENTRO DE ASTROBIOLOGÍA
ASOCIADO AL NASA ASTROBIOLOGY INSTITUTE



CSIC



En memoria de Irene Marguerite McCornack Lamprecht.
Gracias por compartir tu luz, elegancia y bondad con nosotros.

¿Quieres saber cómo lo conseguí? Así es cómo lo conseguí: "jamás me reservé nada para la vuelta".

Gattaca
Andrew Niccol, 1997.

Agradecimientos

Este trabajo no es sólo mío, muchas manos y cabezas han ayudado a que llegara el día de presentar mi tesis doctoral. En este viaje como investigadora predoctoral en el CAB hay muchos compañeros a los que debo agradecer su ayuda y compañía.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director, Eduardo González Pastor, por brindarme la oportunidad de unirme a tu laboratorio. Me ha encantado poder aprender de ti y de tu entusiasmo por la investigación y por *Bacillus*. Siempre has escuchado nuestras sugerencias y nos has apoyado. Además siempre te acompaña ese buen humor y da gusto compartir un rato de conversación contigo.

Olga, mi compañera de trabajo con *Bacillus*, la que me ha enseñado todo lo que sé y de quién admiro su paciencia y tranquilidad, sus ganas de ayudar siempre y su enorme corazón.

Caro, la superwoman del laboratorio, que nos ayuda en todo lo que necesitamos y que organiza todo para que no nos falte de nada. Cómo me ha gustado trabajar contigo y compartir esa alegría!

Salvador, el hombre del laboratorio, muchas gracias por ayudarme con mi primer clonaje y por tu sentido del humor...no lo cambies nunca!

Verónica, admiro las ganas que pones a todo lo que haces, tu simpatía y tus ganas de ayudar. Eres una científica increíble y me ha encantado poder aprender contigo.

Euge, cómo te voy a echar de menos! pero cómo me alegra haberte conocido, y compartir tantas charlas, tantos consejos, tantos buenos momentos. Al principio me imponía mucho tu curriculum, pero me sorprendió tu forma de ser tan cercana y tan humilde.

Qué buenos momentos he pasado durante estos cuatro años en el CAB. No voy a decir todos los nombres porque sois muchos, pero muchas gracias por tantos desayunos, paellas, cafés, celebraciones, comidas y momentos de desestrés que hemos compartido. Os voy a llevar en mi corazón.

A mis niños, cómo me ha gustado conocerlos: Laura, Celia, Pablo, Rafa, Graciela, Jaime.

Patxi, tengo que agradecerte tantas charlas que hemos tenido y tantas risas! siempre serás nuestro Charlie.

Patri, ya sabes lo que has significado para mí durante la tesis, y que ya siempre seremos amigas.

A mis niñas, mis compañeras, Vicky y María, esta tesis ha sido posible gracias a vosotras, siempre habéis estado ahí en cada una de mis frustraciones y de mis alegrías. Tengo mucho que agradeceros.

A mi gente del IIAG! El primer lugar donde aprendí lo que era la investigación. Conchi, Silvia, Vero, Puri, Ana y mi Saleta, muchas gracias por los momentos compartidos y porque siempre me recibís con los brazos abiertos.

A mis amigos de la universidad, del instituto, de la vida. Sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí.

A mi segunda familia, Marisa y Federico por abrirme siempre las puertas y darme tanto cariño.

A mi familia, cómo os echo de menos!

A mis padres, por convertirme en la persona que soy ahora.

A mi hermano, Alfonso, porque me siento muy orgullosa de la persona en que te estás convirtiendo.

A Dani, mi amor, mi amigo y mi compañero.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
AABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN	
DNA extracelular (eDNA) en comunidades microbianas	2
<i>Mecanismos de lisis.....</i>	3
<i>Mecanismos de producción de eDNA no asociados a lisis.</i>	6
<i>Secreción de eDNA mediante vesículas</i>	6
<i>Secreción de eDNA mediante transporte activo a través de la membrana.....</i>	7
<i>Costes de la secreción de eDNA versus beneficios</i>	9
Funciones del eDNA en microorganismos	9
<i>El eDNA como fuente de nutrientes</i>	10
<i>Función del eDNA en transferencia génica horizontal</i>	10
<i>Función del eDNA en la formación de biopelículas.</i>	12
Descripción de la bacteria modelo <i>Bacillus subtilis</i>.....	15
Principales rutas de regulación que gobiernan la diferenciación celular en <i>B. subtilis</i>.....	15
<i>Función del factor de transcripción DegU</i>	18
<i>Función de Spo0A en esporulación, biopelículas y canibalismo</i>	18
<i>Regulación de la competencia en <i>B. subtilis</i> mediante ComA</i>	19
Diferencias fenotípicas entre cepas salvajes y domesticadas en <i>B. subtilis</i>	21
Antecedentes de la producción de eDNA en <i>B. subtilis</i>	21
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	
MATERIALES.....	26
<i>Cepas bacterianas.....</i>	26
<i>Plásmidos utilizados en este trabajo.....</i>	27
<i>Oligonucleótidos utilizados en este trabajo</i>	28
<i>Medios de cultivo y antibióticos</i>	29
MÉTODOS	30
<i>Conservación de las cepas bacterianas</i>	30
<i>Condiciones de cultivo planctónico para la producción de eDNA en <i>B. subtilis</i>.....</i>	30

<i>Transformación bacteriana</i>	30
Transformación de células no competentes, <i>E. coli</i>	30
Transformación de células competentes de <i>Bacillus subtilis</i>	31
<i>Formación de biopelículas en B. subtilis</i>	32
<i>Análisis de la viabilidad bacteriana</i>	32
Aislamiento de ácidos nucleicos	32
Cuantificación de la concentración de eDNA en cultivos planctónicos de <i>B. subtilis</i>	32
Aislamiento y cuantificación de DNA cromosómico de <i>B. subtilis</i>	33
Aislamiento y cuantificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	33
Aislamiento y cuantificación de RNA de <i>B. subtilis</i>	33
Técnicas de biología molecular	33
Digestión de DNA con enzimas de restricción	33
Defosforilación de extremos 5' del DNA con fosfatasa alcalina	34
Ligación de DNA.....	34
Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).....	34
Electroforesis de DNA y RNA	35
Secuenciación de DNA	36
Análisis de actividades enzimáticas	36
Análisis de la actividad DNasa del sobrenadante de 3610.....	36
Ensayos con DNasa I y Nucleasa S1	36
Ensayos de actividad β -galactosidasa	37
Clonaje del eDNA de B. subtilis	37
Construcción de mutantes	37
Construcción de una biblioteca de transposición en 3610	39
Microarrays de DNA	39
Preparación de DNAc marcado con fluorescencia.....	39
Hibridación de sondas de eDNA y DNA cromosómico	40
Análisis de los datos de microchips de DNA.....	40
Citometría de flujo	41

RESULTADOS

Caracterización de la producción de eDNA en la estirpe natural B. subtilis 3610	42
Naturaleza del eDNA en B. subtilis 3610	44
Composición genética del eDNA.....	44
Variabilidad genética del eDNA.....	45
Estudio de la presencia de DNasas en el medio de cultivo de 3610	45
La producción de eDNA no está relacionada con mecanismos de lisis.....	48
Ensayo de actividad β -galactosidasa extracelular.....	48
Estudio de la viabilidad bacteriana durante la producción de eDNA	48
Estudio del efecto sobre la producción de eDNA de mutantes implicados en procesos líticos en <i>B. subtilis</i>	50
Estudio de genes implicados en la producción de eDNA en B. subtilis 3610	51
Análisis del perfil transcripcional de mutantes implicados en la producción de eDNA mediante microarrays.....	54

<i>La producción de eDNA está regulada por genes de la ruta de competencia.</i>	<i>59</i>
<i>Genes de motilidad implicados en producción de eDNA.....</i>	<i>63</i>
<i>Una subpoblación de células con mayor contenido en DNA podría estar implicada en la producción de eDNA.</i>	<i>64</i>
<i>Estudio de la función del eDNA en poblaciones naturales de B. subtilis</i>	<i>67</i>
DISCUSIÓN	
<i>La estirpe no domesticada B. subtilis 3610 secreta todo su cromosoma mediante un mecanismo independiente de lisis.....</i>	<i>72</i>
<i>Genes implicados en competencia y metabolismo de DNA intervienen en la producción de eDNA</i>	<i>74</i>
<i>La ruta de regulación de la producción de eDNA se inicia mediante señales de quorum sensing y genes de competencia temprana</i>	<i>76</i>
<i>Relación entre motilidad y producción de eDNA.....</i>	<i>79</i>
<i>Producción de eDNA por una subpoblación de células</i>	<i>79</i>
<i>Modelo de regulación de la producción de eDNA en B. subtilis 3610.....</i>	<i>80</i>
<i>Función del eDNA en transferencia génica horizontal.....</i>	<i>81</i>
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Mecanismos de producción de eDNA en <i>S. epidermidis</i>	5
FIGURA 2	Vesículas producidas por <i>P. aeruginosa</i>	6
FIGURA 3	Contribución del eDNA en la formación de biopelículas en <i>P. aeruginosa</i>	13
FIGURA 4	Distribución del eDNA en biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i>	14
FIGURA 5	Representación de distintos tipos de diferenciación celular en comunidades de <i>B. subtilis</i>	16
FIGURA 6	Modelo de regulación de DegU en la diferenciación celular en <i>B. subtilis</i>	17
FIGURA 7	Modelo de canibalismo en <i>B. subtilis</i>	19
FIGURA 8	Esquema de las diferentes rutas de regulación involucradas en el desarrollo de la competencia	21
FIGURA 9	Diferencias fenotípicas entre la estirpe de laboratorio PY79 y la estirpe no domesticada 3610	23
FIGURA 10	Esquema explicativo de la mutagénesis mediante la técnica LFH-PCR	38
FIGURA 11	Producción de eDNA en <i>B. subtilis</i> 3610	43
FIGURA 12	Variabilidad durante la producción de eDNA durante el crecimiento de dos estirpes de <i>B. subtilis</i>	43
FIGURA 13	El eDNA producido por <i>B. subtilis</i> 3610 se corresponde con la totalidad del genoma	44
FIGURA 14	El eDNA producido por la estirpe 3610 es de doble cadena	46

FIGURA 15	Estudio de la presencia de DNasas en el medio de cultivo de 3610	47
FIGURA 16	La producción de eDNA en <i>B. subtilis</i> no está relacionada con lisis celular	49
FIGURA 17	Ensayos de viabilidad durante el crecimiento de <i>B. subtilis</i> 3610 durante la producción de eDNA	49
FIGURA 18	Diversos procesos líticos en <i>B. subtilis</i> no afectan a la producción de eDNA	50
FIGURA 19	Fenotipo del mutante espontáneo SPR	52
FIGURA 20	Perfil de transcripción de los genes de 3610 comparado con el de los genes de los mutantes <i>degU::mini-Tn10</i> , <i>oppA::mini-Tn10</i> y SPR	55
FIGURA 21	Resumen de los genes que se inhiben e inducen en el tipo silvestre y en el mutante 3610 SPR de forma significativa diferente	56
FIGURA 22	Resumen de los genes que se inhiben e inducen en el tipo silvestre y en el mutante 3610 <i>degU::mini-Tn10</i> de forma significativamente diferente	57
FIGURA 23	Resumen de los genes que se inducen en el tipo silvestre y en el mutante 3610 <i>oppA::mini-Tn10</i> de forma significativamente diferente	58
FIGURA 24	Diagrama de Venn que ilustra los genes que se inducen redundantemente en el mutante <i>degU::Tn10</i> y en el mutante SPR	59
FIGURA 25	Efecto de las mutaciones en <i>phrC</i> , <i>phrF</i> , <i>phrK</i> y <i>phrG</i> en la producción de eDNA	60
FIGURA 26	Mutantes afectados en competencia temprana <i>comA</i> , <i>srfAA</i> y <i>spo0A</i> son defectivos en la producción de eDNA	61

FIGURA 27	La síntesis de surfactina no está relacionada con la producción de eDNA	62
FIGURA 28	Mutaciones en los genes de competencia tardía <i>comGA</i> , <i>comK</i> y <i>comEA</i> no afectan a la producción de eDNA	63
FIGURA 29	Mutantes afectados en motilidad no producen eDNA	64
FIGURA 30	Las células de la estirpe productora de eDNA presentan una mayor intensidad de fluorescencia con una tinción de DAPI	65
FIGURA 31	Citometría de flujo, gráficos de densidad	66
FIGURA 32	Análisis de citometría de flujo	67
FIGURA 33	Efecto de la producción de eDNA durante la formación de biopelículas en varias mutantes defectivos en producción de eDNA	68
FIGURA 34	Relación de los fenómenos de competencia y la producción de eDNA en <i>B. subtilis</i>	69
FIGURA 35	Análisis de la transformabilidad del eDNA en <i>B. subtilis</i>	70
FIGURA 36	Regulación de la competencia en <i>B. subtilis</i>	78
FIGURA 37	Posible ruta de regulación que gobierna la secreción de eDNA en <i>B. subtilis</i> 3610	81

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1:	Cepas de <i>Bacillus subtilis</i> usadas en este trabajo	26
TABLA 2:	Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en este trabajo	27
TABLA 3:	Plásmidos utilizados en este trabajo	27
TABLA 4:	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	28
TABLA 5:	Genes implicados en la producción de eDNA identificados en la biblioteca de transposición	55
TABLA 6:	Genes inhibidos en el mutante 3610 SPR durante la producción de eDNA en 3610	95
TABLA 7:	Genes inducidos en el mutante 3610 SPR durante la producción de eDNA en 3610	96
TABLA 8:	Genes inhibidos en el mutante 3610 <i>degU::mini Tn10</i> durante la producción de eDNA en 3610	98
TABLA 9:	Genes inducidos en el mutante 3610 <i>degU::mini Tn10</i> durante la producción de eDNA en 3610	101
TABLA10	Genes inhibidos en el mutante 3610 <i>oppA::mini Tn10</i> durante la producción de eDNA en 3610	103
TABLA 11	Gen inducido en el mutante 3610 <i>oppA::mini-Tn10</i> durante la producción de eDNA en 3610	103

ABREVIATURAS

A_{600nm}: absorbancia a 600 nm

AHL: *acylated homoserine lactone* (lactona homoserina acetilada)

Ap^R: resistencia a ampicilina

ATP: trifosfato de adenosina

C: grados centígrados

cDNA: DNA complementario

CIAP: fosfatasa alcalina de intestino de ternera

Crio-TEM: criomicroscopía electrónica de transmisión

CSF: *competence and sporulation factor* (factor de estimulación de la competencia)

CSP: *competence stimulating peptide* (péptido estimular de la competencia)

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenil-indol

DDO: 1,3-Dicloro-9,9-dimetil de acridina-2-ona

DiOC₂: Ioduro de 3,3 Dietil-oxo-carbocianina

DNA: ácido desoxirribonucleico

eDNA: DNA extracelular

dNTP: trifosfato desoxirribonucleico

dsDNA: DNA de doble cadena

EDTA: ácido etil-endiamino-tetra-acético

EPS: sustancia polimérica extracelular

Er^R: resistencia a eritromicina

FSC-H: *Foward Scatter-Height*, parámetro que permite conocer el tamaño celular

GFP: *Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

GGI: isla genética presente en *Neisseria gonorrhoeae*

GTE: tampón cuya composición contiene Glucosa, EDTA y Tris-HCl

h: hora

HMW: alto peso molecular

Km^R: resistencia a canamicina

LB: medio Luria Bertani

LFH-PCR: *PCR-synthesis of disruption cassettes with long flanking homology* (generación de mutantes nulos a través de amplificación por PCR de fragmentos largos homólogos)

LMW: bajo peso molecular

MCM: medio de competencia

MCS: sitio de clonaje múltiple

mls: antibiótico compuesto por lincomicina y eritromicina

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico

MSgg: medio mínimo

P: fosfato

pb: pares de bases

PBS: tampón salino de fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PQS: *pseudomonas quinolone signal* (señal quinolona de *Pseudomonas*)

RNA: ácido ribonucleico

Sb: sobrenadante

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SPC^R: resistencia a espectinomicina

SPR: *spread*, extendido

Taq: *Termus aquaticus*

TBE: tampón cuya composición contiene Tris-Borato-EDTA

tRNA: RNA de transferencia

UFC: unidad formadora de colonia

UV: ultravioleta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

σ^D : factor sigma D de la RNA polimerasa

ABSTRACT

ABSTRACT

Extracellular DNA (eDNA) release is a widespread capacity described in many microorganisms. We identified and characterized lysis-independent eDNA production in an undomesticated strain of *Bacillus subtilis*. DNA fragments are released during a short time in late-exponential phase. The released eDNA corresponds to whole genome DNA, and does not harbour mutations suggesting that is not the result of error prone DNA synthesis. The absence of eDNA was linked to a spread colony morphology, which allowed a visual screening of a transposon library to search for genes involved in its production. Transposon insertions in genes related to quorum sensing and competence (*oppA*, *oppF* and *comXP*) and to DNA metabolism (*mfd* and *topA*) were impaired in eDNA release. Mutants in early competence genes such as *comA* and *srfAA* were also defective in eDNA while in contrast mutations in late competence genes as those for the DNA uptake machinery had no effect. A subpopulation of cells containing more DNA is present in the eDNA producing strains but absent from the eDNA defective strain. Finally, competent *B. subtilis* cells can be transformed by eDNA suggesting it could be used in horizontal gene transfer and providing a rationale for the molecular link between eDNA release and early-competence in *B. subtilis* that we report.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. *DNA extracelular (eDNA) en comunidades microbianas*

Numerosas especies de bacterias y arqueas tienen la capacidad de liberar DNA al medio extracelular (eDNA) (Catlin; 1960; Tani y Nasu; 2010; Hara y Ueda 1981;). Por otra parte, se ha descrito la presencia de eDNA en biopelículas en ambientes naturales, sedimentos marinos y ambientes acuáticos (Paul y cols. 1987, Nielsen y cols, Whitchurch 2002).

En ambientes naturales se ha encontrado eDNA en concentraciones variables, hasta 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ en suelo y hasta 88 $\mu\text{g L}^{-1}$ en ambientes acuáticos (Ogram y cols; 1987, Tani y Nasu; 2010; Karl y Bailiff, 1989). El rango de tamaño de las moléculas de eDNA en muestras purificadas a partir de sedimentos naturales varía desde unos cientos hasta treinta mil pares de bases (pb) (Tani y Nasu; 2010) y el tiempo de renovación y degradación de eDNA en los sedimentos varía dependiendo de los estudios realizados, siendo el rango de renovación de seis horas hasta veinte días (Paul y cols; 1987). Además de estar presente en ecosistemas naturales, se ha cuantificado concentraciones de hasta 0,1 mg ml^{-1} de eDNA procedente de células eucariotas y procariotas en el intestino de mamíferos y en pulmones humanos, elevándose la concentración a 4 mg ml^{-1} en pacientes con fibrosis quística (Potter y cols; 1967).

El eDNA en ambientes naturales proviene principalmente de células y virus, existiendo distintos mecanismos que producen su liberación dependiendo del microorganismo, como autólisis, infección de fagos, depredación y transporte activo entre otros.

El eDNA se ha podido detectar en condiciones de laboratorio en el sobrenadante de cultivos de especies de numerosos géneros bacterianos, incluyendo *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Caulobacter*, *Escherichia*, *Deinococcus* y *Pseudomonas* (Lorenz y cols; 1991; Hamilton y cols; 2001; Dillard y Seifer; 2001; Qin y cols; 2007; Berne y cols; 2010; Matsui y cols; 2003, Battista; 1997; y Allense-Holm y cols; 2006).

En cultivos planctónicos, la producción de eDNA de *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* se caracterizan por una producción de eDNA basal en la fase de crecimiento exponencial, seguida de un rápido incremento en la concentración en

INTRODUCCIÓN

la transición de fase exponencial a estacionaria, siendo el máximo de producción al inicio de la fase estacionaria (Moscoso y cols; 2004, Allensen-Holm y cols; 2006). Además se ha observado la presencia de gran cantidad de eDNA en biopelículas de *P. aeruginosa* y *B. cereus* (Winchurch y cols; 2002; Vilain y cols; 2009).

Estos estudios ponen de manifiesto que la presencia de eDNA en altas concentraciones está ampliamente distribuida en los ecosistemas microbianos, lo que justifica un estudio en profundidad de este fenómeno para una mejor comprensión de la función del eDNA en las comunidades microbianas.

1.1 Mecanismos de producción de eDNA en microorganismos

La molécula de DNA no puede atravesar la membrana celular de forma pasiva debido a su complejidad, por lo que, para su liberación al medio extracelular, debe existir un mecanismo que facilite el paso a través de la membrana. Las formas mediante las que el DNA puede alcanzar el medio extracelular son, principalmente, la lisis celular o bien el transporte activo.

1.1.1 Mecanismos de lisis

En los primeros estudios en donde se describe la presencia de grandes cantidades de eDNA en sedimentos marinos y suelos se relacionó este depósito con procesos espontáneos de lisis, asociados a la muerte natural de los microorganismos y externalización del contenido citoplasmático.

Estudios más exhaustivos en diferentes especies bacterianas han permitido identificar la existencia de mecanismos específicos que inducen la liberación de eDNA a través de lisis celular inducida por señales de *quorum sensing*, mecanismo de señalización celular que activa diversos tipos de respuesta cuando la población alcanza una densidad determinada.

Uno de los ejemplos más estudiados en bacterias Gram negativas es el de *Pseudomonas aeruginosa*. Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* están controlados por uno de los sistemas de *quorum sensing* presentes en la célula, el sistema *lasRI* y *rhIRI* (Passador y cols; 1993). Otros sistemas pertenecientes al sistema

INTRODUCCIÓN

de *quorum sensing* son las moléculas de señalización AHL (*acylated homoserine lactone*) (Givskov y cols; 1996) y las quinolonas PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) (Pesci y cols. 1999). Los primeros estudios realizados por Hara y Hueda en 1981 determinaron una producción de eDNA en torno a $7,8 \text{ mg ml}^{-1}$ en poblaciones de *P. aeruginosa* KYU-1, y determinaron que inhibidores de la síntesis de DNA inhibían la producción de eDNA. Posteriormente, Allensen-Holm y cols; 2006 identificaron que las mutaciones en los sistemas de *quorum sensing*, *lasI rhII* y *pqsA*, inducen un descenso en la producción de eDNA. El fenotipo de la mutación *lasI rhII* se complementaba al añadir al medio AHL o al inducir una sobreexpresión de quinolonas. En este trabajo se concluyó que la producción de eDNA era debida a lisis de una subpoblación de células, mediante la medición de la actividad enzimática β galactosidasa extracelular, y esta lisis era debida a señales de *quorum sensing* y propagación de fagos.

Por otro lado, un ejemplo de producción de eDNA asociada a lisis celular regulada en una bacteria Gram positiva es el de *Streptococcus pneumoniae*, que es competente natural, es decir tiene la capacidad de adquirir e integrar en su genoma DNA exógeno (Dubnau, 1999). En microorganismos Gram positivos las señales de *quorum sensing* están basadas en señales peptídicas y, entre otros fenómenos, regulan las rutas de competencia y la formación de biopelículas. En *S. pneumoniae*, cuando el CSP (*Competence Stimulating Peptide*) alcanza una concentración entre 1 y 10 ng ml^{-1} en el medio, se desencadenan señales intracelulares que van a inducir la competencia (Håvarstein y cols; 1995). El estudio realizado por Moscoso y cols; 2004, determinó que la producción de eDNA se induce únicamente en condiciones que permiten la expresión de la competencia y se observó que el CSP induce la liberación de eDNA tanto en mutantes que no pueden producir CSP, como en mutantes que no pueden exportarlo, lo que indica que la liberación de eDNA y la competencia están controlados mediante la misma ruta de regulación. A su vez han identificado que la autolisina mayoritaria en *S. pneumoniae* LytA y la lisozima autolítica LytC están implicadas en la producción de eDNA, y no descartan la existencia de otra tercera actividad hidrolítica que pueda contribuir al proceso, ya que la construcción del doble mutante en la cepa isogénica no suprime completamente la producción de eDNA. LytA está presente en bacterias no competentes, pero su transcripción se sobreexpresa hasta seis veces más

INTRODUCCIÓN

en células competentes (Rimini y cols; 2000). Se ha identificado, mediante mediciones de la actividad β -galactosidasa en el sobrenadante, la lisis de una fracción de la población del 5-20 % de células competentes y que actúan como donadores de eDNA (Steinmoen y cols; 2002). Por otra parte, el trabajo de Carrolo y cols; 2010, proporciona evidencias de que el fago SV1 presente en la estirpe R36AP, activa la formación de biopelículas en *S. pneumoniae* y contribuye a los procesos de lisis que inducen la liberación de eDNA.

En biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* se observó la producción de eDNA mediante la acción de la autolisina AtlE, induciendo la lisis de una parte de la población (Qin y cols; 2007). Previamente se describió que la expresión de la autolisina AtlE y la formación de biopelículas están incrementadas en los mutantes *agr* afectados en *quorum sensing* (Vuong y cols; 2003), por lo que estos autores sostienen que la producción de eDNA en *S. epidermidis* está regulada por el sistema de señalización por *quórum sensing*, *agr*.

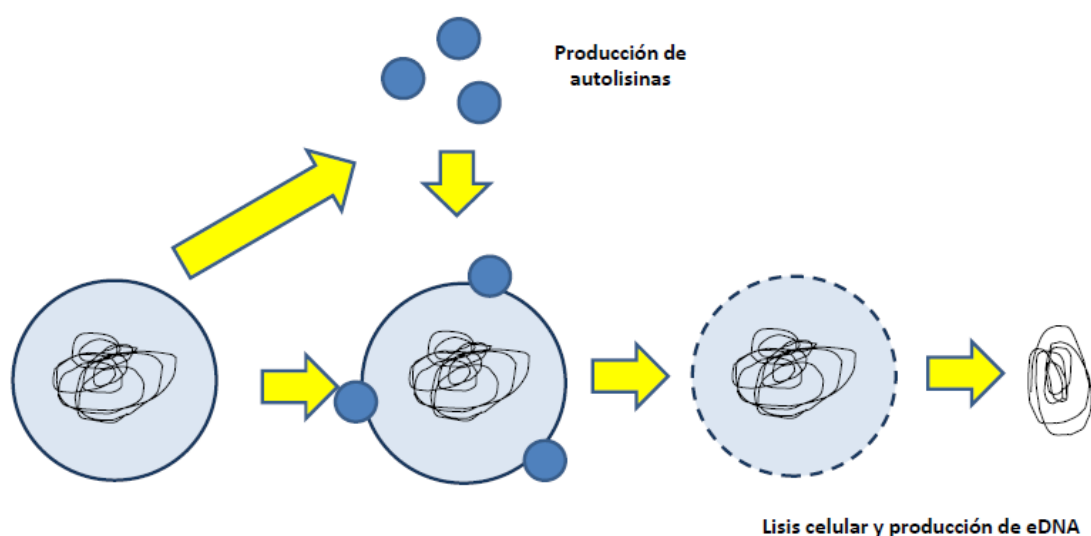


Figura 1. Mecanismo de producción de eDNA en *S. epidermidis*. La liberación de eDNA al medio se produce mediante el suicidio de las células de la población a través de la acción de la autolisina mayoritaria AtlE. Esquema adaptado de Tani y Nasu; 2010.

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, estudios en otros microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *Caulabacter crescentus* y *Staphylococcus aureus* también apuntan a una lisis regulada para la producción de eDNA (Thomas y cols; 2009; Berne y cols; 2010; Kaplan y cols; 2012).

En resumen, el mecanismo de producción de eDNA mediante lisis celular inducida por señales de *quorum sensing* está ampliamente extendido en bacterias. Siendo los principales mecanismos que producen lisis, las proteínas autolisinas y los fagos.

1.1.2 Mecanismos de producción de eDNA no asociados a lisis.

1.1.2.1 Secreción de eDNA mediante vesículas

La formación de vesículas en el citoplasma de bacterias Gram negativas es bastante común y se ha descrito en varios géneros como *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Pseudomonas* (Kahn y cols; 1982; Dorward y Garon, 1989; Kadurugamuwa y Beveridge; 1995). Algunas posibles funciones para estas vesículas están relacionadas con la predación, factores de virulencia o la liberación de eDNA al medio (Kadurugamuwa y Beveridge; 1996; Renelli y cols; 2004). Se ha descrito la presencia de DNA en vesículas tanto de origen cromosómico, plasmídico e incluso de bacteriófagos.

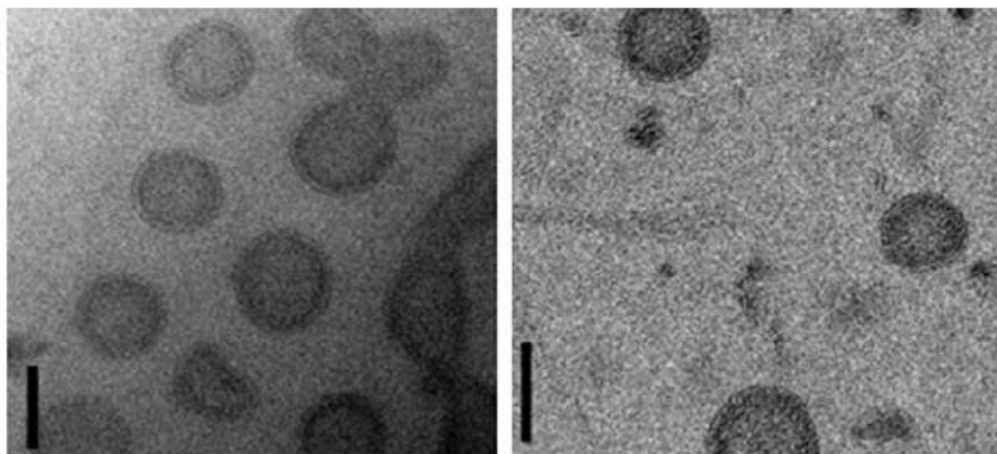


Figura 2. Vesículas producidas por *P. aeruginosa*. Imágenes obtenidas mediante crio-TEM. La barra representa 100 nm. Imágenes extraídas del artículo de Renelli y cols; 2004

INTRODUCCIÓN

Estas vesículas son transportadas a través del citoplasma, atraviesan la membrana plasmática y son liberadas en el periplasma (Kadurugamuwa y Beveridge; 1995). Son muy abundantes en biopelículas de bacterias Gram negativas y se cree que el contenido de las vesículas puede ayudar a su formación (Schooling y Beveridge; 2006)

Renelli y cols; 2004 realizaron un estudio sobre la naturaleza y el contenido de las vesículas en las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 en presencia o en ausencia del plásmido pAK1900. En ambos casos se producen vesículas, pero solamente en la cepa que porta el plásmido se ha detectado DNA. Análisis fluorométricos revelaron una concentración de 7,8 ng de DNA y 20 µg de proteína por vesícula. Por otro lado, no consiguieron que *P. aeruginosa* ni en *E. coli* DH5α se transformaran con el DNA presente en las vesículas. Por lo que concluyen que sus métodos de transformación no son eficientes o bien el papel de este eDNA reside en una contribución a la formación y establecimiento de biopelículas.

1.1.2.2 Secreción de eDNA mediante transporte activo a través de la membrana

La existencia de un complejo de membrana que permite la exportación de DNA al espacio extracelular fue descrita por primera vez en *Deinococcus radiodurans* en 1971 (Burrell y cols; 1971). Las bacterias del género *Deinococcus* poseen una capacidad extraordinaria para resistir los efectos mutagénicos de agentes que dañan el DNA (radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y agentes que producen *cross-linking*), es aproximadamente 200 veces más resistente que *E. coli* (Battista; 1997). Un factor importante en la reparación de daño en el DNA es que durante el crecimiento exponencial se replica activamente sin producirse división celular, produciendo de cuatro a diez equivalentes de su genoma (White y cols; 1999). La causa de la alta tolerancia al daño de DNA es debido a que las radiaciones ionizantes y UV inducen una degradación del DNA y su posterior transporte al exterior celular una mezcla de oligonucleótidos dañados y no dañados de diferente longitud, en su mayoría dímeros de timina u oligonucleótidos (Battista; 1997). Se ha propuesto que el complejo responsable de este transporte son dos proteínas homólogas a UvrA (UvrA1 y UvrA2), ambas proteínas tienen secuencias con alta similitud a transportadores ABC y se ha descrito que UvrA ancla nucleótidos a la membrana de *E. coli* durante procesos de

INTRODUCCIÓN

reparación de DNA (Bauche y Laval; 1999). Por otro lado, UvrA2 está emparentada a la proteína DrrC que se encarga de la exportación de antibióticos fuera de la célula en *Streptomyces peucetius* (White y cols; 1999).

Estudios iniciales en *Neisseria gonorrhoeae* establecieron la existencia de una liberación de eDNA durante la fase de crecimiento estacionario (Morse y Bartenstein; 1974). *N. gonorrhoeae* es naturalmente competente y parte del DNA que se libera actúa como donador durante la transformación (Smith y cols; 1995). En 2001, Dillard y Seifert identificaron una isla genética de aproximadamente 70 Kb en *N. gonorrhoeae* (GGI) que está presente en el 80% de las estirpes y que contiene secuencias homólogas a genes involucrados en procesos de conjugación. Observaron que una mutación en un gen de la GGI que codifica para una hidrolasa de peptidoglicano, inhibe la producción de eDNA en la fase exponencial (a las 4 h de crecimiento), en esta fase los procesos de lisis no son significativos. En la fase estacionaria la producción de eDNA es independiente a este fenómeno y están implicados procesos de lisis. El 75 % de los genes presentes en GGI tienen una similitud significativa con genes del plásmido F de *E. coli* o con genes que codifican para sistemas de secreción tipo IV, e identificaron siete genes que disminuían significativamente la producción de eDNA. Por otro lado, mediante tinción diferencial de células vivas/muertas, identificaron que no existían diferencias en el porcentaje de células muertas entre la estirpe *N. gonorrhoeae* MS11A y los diferentes mutantes durante la fase exponencial (Hamilton y cols; 2001; Hamilton y cols; 2005). De estos resultados concluyen que la GGI codifica para un sistema de secreción tipo IV cuyos componentes son necesarios para la secreción de eDNA y no están implicados procesos de lisis.

Por otro lado, los estudios previos de Thomas y cols; 2009 describen la producción de eDNA en biopelículas de *Enterococcus faecalis* a las 24 h de crecimiento y relacionan dicha producción con señales *quorum sensing* que inducen una lisis celular. Sin embargo, los estudios de Barnes y cols; 2012 en biopelículas crecidas 4 horas observan una gran producción de eDNA no asociada a lisis. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la combinación de anticuerpos monoclonales anti-dsDNA y una sonda fluorescente DiOC₂ que permite discriminar células metabólicamente activas,

INTRODUCCIÓN

identificaron que la acumulación de eDNA estaba próxima a células vivas y con una actividad metabólica incrementada, lo que puede reflejar una síntesis de ácidos nucleicos incrementada o a un transporte activo en la membrana y que descartan mecanismos de lisis. Este estudio propone como transportador el aparato conjugativo que se encuentra codificado por el plásmido pCF10.

Otros estudios en biopelículas de *Bacillus cereus*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus gordonii* descartan mecanismos de lisis para explicar la producción de eDNA (Vilain y cols; 2009, Kreth y cols; 2009).

1.1.3 Costes de la secreción de eDNA versus beneficios

La secreción de eDNA proporciona una ventaja selectiva en las poblaciones de microorganismos debido a que tiene distintas funciones como intervenir en la formación de biopelículas, intercambio de material genético o servir como fuente de nutrientes. Pero esta estrategia parece inestable ya que mutantes que no tengan esta maquinaria de secreción evitarán los costes de su producción y el gasto de ATP a la vez que mantienen los mismos beneficios a través de mecanismos de lisis, lo que conduciría a que el mecanismo de secreción se extinga. Pero Dragui y Turner (2006) demostraron mediante un modelo matemático que la selección del fenotipo secretor se produce gracias a un balance entre dos niveles, un nivel de selección viene determinado por la tasa de crecimiento frente a la velocidad de recambio de la población y el segundo nivel actúa en el equilibrio entre la tasa de secreción de genes beneficiosos frente a la tasa de transformación y degradación del eDNA. Por lo que el ambiente idóneo para la existencia del fenotipo secretor será aquel que permita la existencia de poblaciones con células relativamente próximas, con tasas de recambio de población bajas, una tasa alta de transformación, en un ambiente con altos niveles de actividad metabólica y gran persistencia del eDNA.

1.2 Funciones del eDNA en microorganismos

La producción de eDNA está muy extendida entre especies bacterianas que tienen diferentes características y nichos ecológicos: competencia natural, patogenicidad, formación de biopelículas, etc. Por tanto, es difícil hablar de una función universal y

INTRODUCCIÓN

encontramos diferentes papeles del eDNA dependiendo del microorganismo estudiado.

1.2.1 *El eDNA como fuente de nutrientes*

Debido a su composición química el DNA es una fuente en potencia de carbono, nitrógeno y fósforo. En los ambientes acuáticos, el eDNA es un importante componente de la materia orgánica y puede ser una fuente de energía y nutrientes (Tani y Nasu; 2010). Lennon y cols; 2007 utilizaron como fuente principal de carbono, nitrógeno y fósforo, DNA de bajo peso molecular (LMW) y alto peso molecular (HMW) y cultivaron bacterias aisladas de muestras de agua marina. Como resultado observaron que la diversidad bacteriana era significativamente diferente en ambas condiciones, sólo un 22% de los taxones podían usar como fuente de nutrientes ambos tipos de DNA. El crecimiento era más rápido en las bacterias que crecían en el medio con DNA-LMW y la velocidad de degradación enzimática del DNA es mayor en las bacterias que crecen en medio con DNA-HMW.

Se ha descrito que *E. coli* puede utilizar como fuente de carbono DNA y que esta habilidad es necesaria para la supervivencia competitiva de *E. coli* durante una incubación prolongada (Finkel y Kolter; 2001). Se desconoce que *E. coli* tenga competencia natural pero se han identificado varios genes que presentan alta homología con genes involucrados en competencia y transformación génica en *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*. Se observó que la mutación de los ocho genes *com* homólogos a genes de competencia presentes en *E. coli* K-12 perdían la habilidad para usar DNA como fuente de energía Palchevskiy y Finkel; 2006. Además las células con estas mutaciones eran menos eficaces cuando competían con células silvestres. Estos resultados indican que *E. coli* posee una maquinaria para la entrada de DNA (genes homólogos *com*) que le permite el consumo de DNA como nutriente.

1.2.2 *Función del eDNA en transferencia génica horizontal*

La transformación genética natural es el mecanismo que permite la entrada activa de eDNA (plasmídico o cromosómico) en las células y su incorporación al material genético de forma heredable. Este proceso, junto a la conjugación y transducción son

INTRODUCCIÓN

los mecanismos de transferencia génica horizontal que operan en las bacterias. Se han descrito al menos cuarenta géneros de bacterias y arqueas que tienen la capacidad de competencia natural (Lorenz y Wackernagel; 1994). Los requisitos para la transformación natural son la existencia y persistencia de eDNA en el medio y la presencia de un mecanismo eficiente para la incorporación del eDNA al interior celular, su estabilización e integración en el genoma bacteriano (Lorenz y Wackernagel, 1994; Dubnau; 1999).

Solamente en *Neisseria gonorrhoeae* se ha descrito que el fenómeno de competencia es constitutivo (Sparling; 1966), en el resto de bacterias el desarrollo de la competencia se induce en respuesta a señales ambientales como condiciones de crecimiento, acceso a nutrientes y densidad celular (determinada por *quorum sensing*) (Dubnau; 1999). La competencia se puede desarrollar al inicio del crecimiento y alcanzar el máximo durante la fase o en la transición entre las fases exponencial y estacionaria. La fracción competente puede estar constituida por un pequeño porcentaje o cerca del 100% de la población (Dubnau; 1999).

En muchos géneros de bacterias Gram negativas solamente se transforman secuencias específicas de DNA como en *Neisseria* o en *Haemophilus* (Goodman y Scocka; 1988; Danner y cols; 1980). Otras especies, como en *Acinetobacter* no se produce una discriminación entre secuencias homólogas y no homólogas (Dubnau; 1999), aunque la transformación con secuencias no homólogas es 10^9 veces menor que la recombinación con DNA homólogo.

La persistencia del eDNA va a determinar la frecuencia de transformación natural. La cinética de degradación del eDNA varía notablemente dependiendo de las condiciones ambientales y pese a que la presencia de DNasas en suelos está ampliamente extendida. Ensayos de transformación natural en muestras donde se añadían ácidos nucleicos puros en diferentes sustratos como suelos, agua, saliva humana o varios tipos de comida, determinan que el DNA no se degrada inmediatamente y que puede permanecer durante horas o días (Nielsen y cols; 2007).

INTRODUCCIÓN

1.2.3 Función del eDNA en la formación de biopelículas.

En ecosistemas naturales los microorganismos crecen preferencialmente formando estructuras multicelulares denominadas biopelículas, las células se adhieren al sustrato y se rodean de una matriz extracelular (Costerton y cols; 1995). En este tipo de crecimiento, los microorganismos poseen una mayor resistencia a antibióticos, detergentes y agentes antimicrobianos (Mah y O'Toole; 2001). La matriz está compuesta por la denominada sustancia polimérica extracelular (EPS) que constituye el 90 % de la masa del biopelículas y que está íntegramente segregada por las células. El EPS es una mezcla heterogénea de exopolisacáridos, proteínas, DNA y otras macromoléculas (Sutherland; 2001).

Se han identificado evidencias de la función del eDNA en la interconexión celular en los primeros estadios de formación de biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 y aislados clínicos de *P. aeruginosa*. (Whitchurch y cols; 2002; Nemoto y cols; 2003). El tratamiento con DNasa I produce una desagregación de las biopelículas recién establecidas, sin embargo las biopelículas maduras sólo se ven afectadas marginalmente por el tratamiento, lo que indica que el eDNA tiene un papel estructural en los primeros estadios de la formación de la biopelícula, pero en etapas posteriores la conexión celular se produce mediante otros compuestos. Por otro lado, el inicio de la formación de biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis* también se ve afectado por la adicción de DNasa I, sin embargo al añadir DNasa I a las 24 h de la formación de la biopelícula el efecto es diferente, afectando sólo a las biopelículas de *S. aureus*, de lo que se deduce que existen diferentes roles estructurales del eDNA (Izano y cols; 2008).

INTRODUCCIÓN

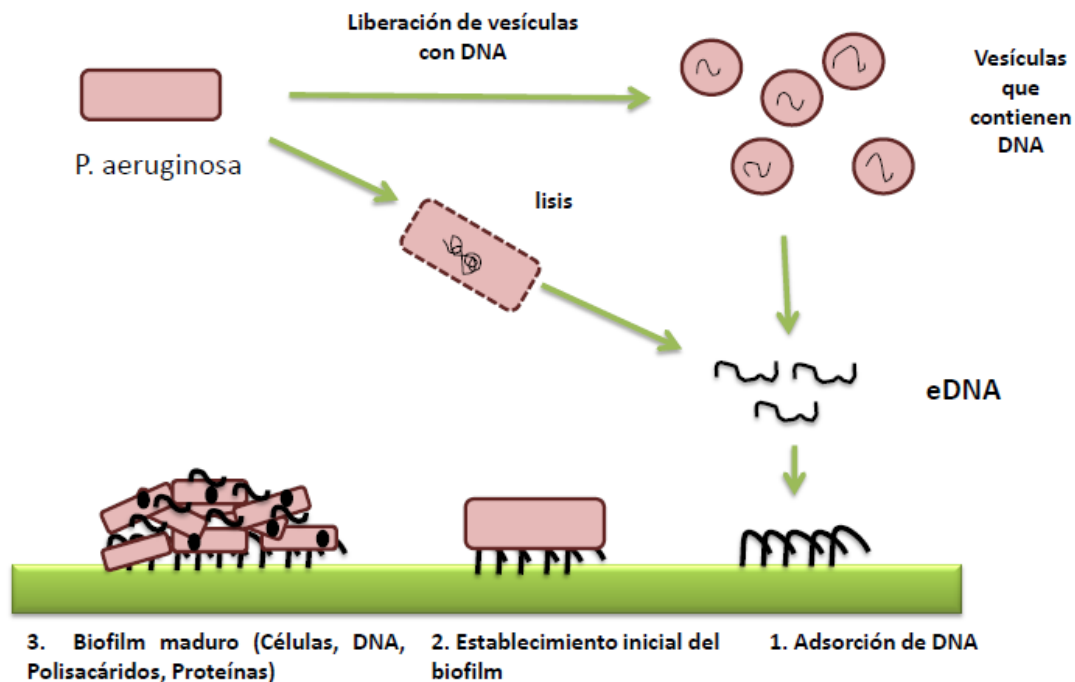


Figura 3. Contribución del eDNA en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*. Esquema que representa los dos orígenes propuestos para el eDNA en *P. aeruginosa* y su función en el establecimiento inicial de las biopelículas. Esquema adaptado de Tani y Nasu; 2010.

Se han identificado genes involucrados en la síntesis de purinas (*purA*, *purC* y *purL*) que producen un descenso en la producción de eDNA en *Bacillus cereus* y en la capacidad de producir biopelículas, por lo que se demuestra que la presencia del eDNA es necesaria para el correcto establecimiento de biopelículas en *B. cereus* (Vilain y cols; 2009).

Se ha observado en las biopelículas de *P. aeruginosa* y *E. faecalis* que la distribución del eDNA no es homogénea sino que existe una distribución específica. Las biopelículas de *P. aeruginosa* forman unas estructuras multicelulares en forma de "seta", que constan de una base constituida por células inmóviles y la zona superior de la estructura está compuesta por células móviles que migran a través de la base. Usando microscopía confocal y varias tinciones de DNA Allense-Holm y cols; 2006 observaron que, a los 6 días, en las biopelículas de *P. aeruginosa*, el eDNA se localizaba mayoritariamente formando láminas discretas concéntricas en la base. Este resultado parece indicar que el eDNA es liberado por las células móviles que se desplazan por la

INTRODUCCIÓN

base y que posteriormente forman las estructuras en forma de seta en la zona superior. Mediante microscopía SEM en *E. faecalis* se ha observado que, a las 4 horas de crecimiento de las biopelículas, el eDNA se localiza preferencialmente en dos dominios diferenciados: en el espacio intercelular formando estructuras alargadas y en dominios globulares formando parte mayoritaria de la matriz de las biopelículas (Barnes y cols; 2012).

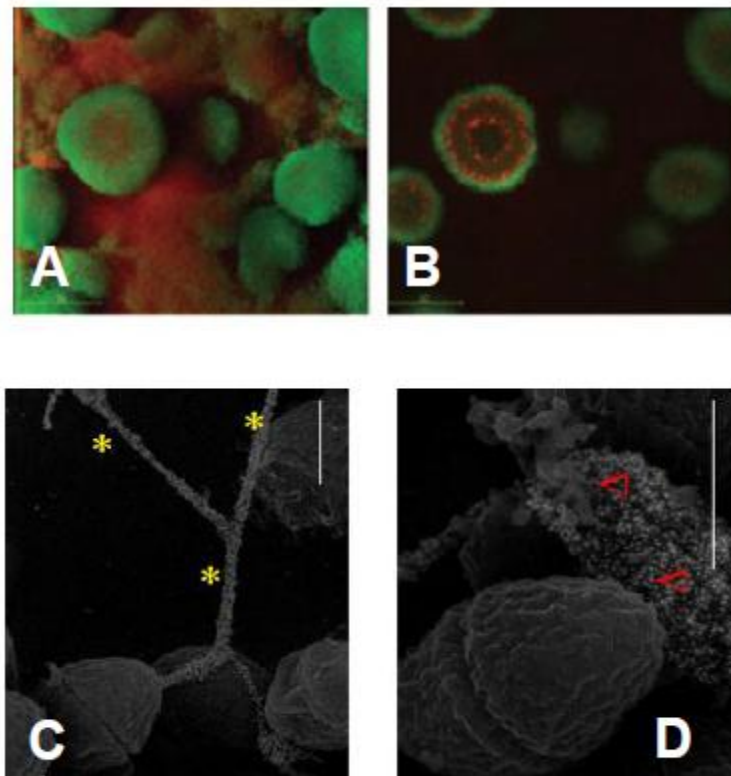


Figura 4. Distribución del eDNA en biopelículas de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. . Las imágenes A y B muestran biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1, que expresa GFP (*green fluorescent protein*) de forma constitutiva. El eDNA se ha teñido con DDAO (fluoróforo que tiene afinidad por ácidos nucleicos, pero no atraviesa la membrana celular). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. A) Vista aérea B) corte transversal de las denominadas estructuras en forma de “seta” de biopelículas tras 6 días de crecimiento (Allensen-Holm y cols; 2006). Las imágenes C y D muestran biopelículas de *E. faecalis*. El eDNA se visualiza mediante marcaje con anticuerpos monoclonales. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía SEM. C) eDNA formando estructuras longitudinales (*) D) eDNA en estructuras globulares (Δ) en biopelículas tras 4 h de incubación (Barnes et. al; 2012).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, el papel del eDNA en las biopelículas no solo es estructural, en *P. aeruginosa* se ha observado que el eDNA induce resistencia a antibióticos, a concentraciones sub-inhibitorias. El eDNA crea un ambiente catiónico limitado, lo que produce una inducción de un operón de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* (Mulcahy y cols; 2008).

2. DESCRIPCIÓN DE LA BACTERIA MODELO *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram positiva, no patógena, que ha sido aislada de un gran número de ambientes, terrestres y acuáticos, incluso en asociación con las raíces de plantas o en heces de animales (Earn y cols; 2008). *B. subtilis* tiene la capacidad de formar subpoblaciones que se diferencian fenotípicamente pero no genotípicamente, debido a que las células de la población responden a diferentes señales y producen distintas funciones dentro de la comunidad (López y Kolter; 2010). La capacidad de producir formas de resistencia denominadas endosporas en respuesta a privación de nutrientes o estrés ambiental es un proceso de diferenciación celular que no ocurre en toda la población (Freese; 1972; Chung y cols; 1994). Otros procesos que sólo están presentes en una fracción de la población, son el estado de competencia (Smits y cols; 2005), el desarrollo de la motilidad (Kearns y losick; 2005) y la producción de matriz extracelular en los biopelículas (Chai y cols; 2008). La diferenciación en subpoblaciones en *B. subtilis* está inducida por tres reguladores clave: DegU, Spo0A y ComA que se activan mediante fosforilación e inducen la expresión de genes específicos (López y Kearns; 2010) (Fig. 5).

2.1 Principales rutas de regulación que gobiernan la diferenciación celular en *B. subtilis*

2.1.1 Función del factor de transcripción DegU

Las funciones que realiza el factor de transcripción DegU dependen de su estado de fosforilación, siendo DegS el donador de fósforo y DegQ la quinasa que cataliza distintos grados de fosforilación (Kunst y cols; 1994). DegU es un regulador que actúa sobre varios procesos celulares y en el que su función depende del equilibrio entre la

INTRODUCCIÓN

forma fosforilada y defosforilada. Así, la forma no fosforilada de DegU se une al promotor de *comK*, y recluta la unión de ComK a su propio promotor, creando una

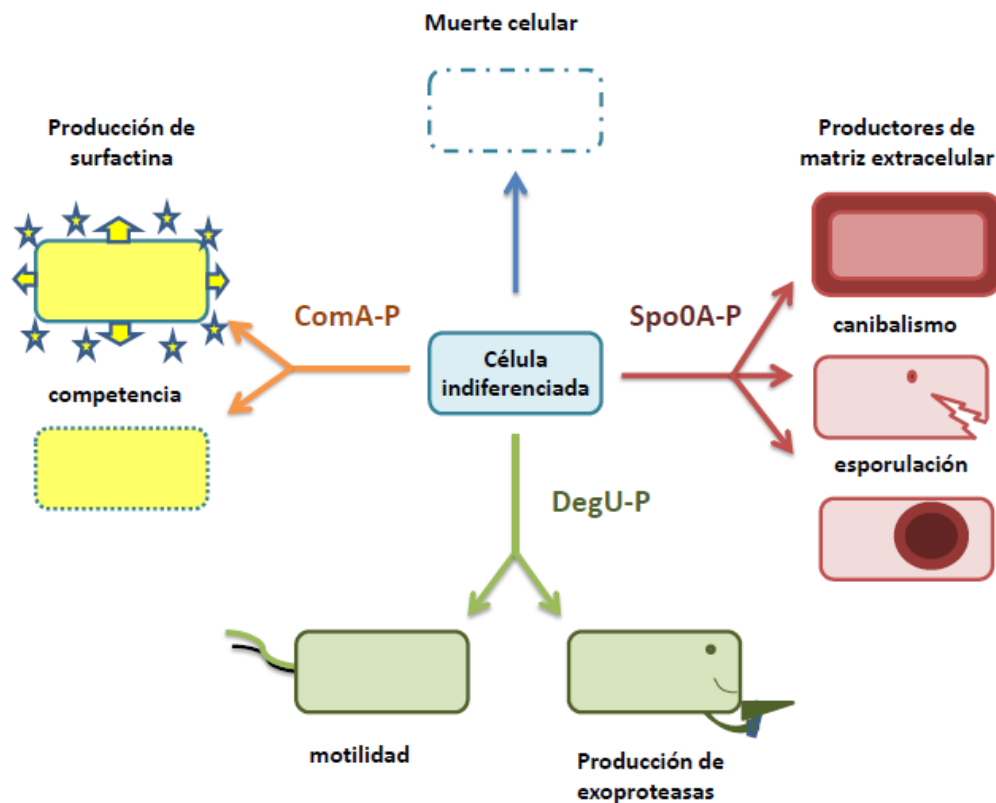


Figura 5. Representación de distintos tipos de diferenciación celular en comunidades de *B. subtilis*. Los tipos celulares se han clasificado en grupos dependiendo del regulador clave (ComA, Spo0A o DegU) que induce su diferenciación y se han caricaturizado atendiendo a su atributo más característico. Esquema adaptado de López y Kolter; 2010.

retroalimentación positiva y aumentando su transcripción, esto produce la expresión de proteínas de competencia tardía y la síntesis del sistema de transporte que importa el DNA durante la competencia (Hamoen y cols; 2000). Una concentración baja de la forma fosforilada de DegU (DegU~P) induce la transcripción de genes implicados en la formación de flagelo y motilidad durante fase exponencial (Kobayashi; 2007). Por otro lado, un aumento del grado de fosforilación (DegU~PP) dependiente de DegS está implicado en la regulación de la complejidad morfológica de la colonia y la formación de biopelículas (Verhamme y cols; 2007; Kobayashi; 2007). Verhamme y cols; 2007 han identificado que es necesario un estado de fosforilación muy alto (DegU~PPP) para que se produzca la secreción de exoproteasas y además este estado inhibe que se formen

INTRODUCCIÓN

colonias con morfología compleja. La forma fosforilada de DegU activa su propia expresión, por lo que la fosforilación de DegU no sólo incrementa su actividad sino que también su concentración intracelular. Se ha identificado que la unión de DegU al promotor de la proteasa extracelular *aprE* tiene menor afinidad que al de *flgB*, y que su estado de fosforilación aumenta la afinidad por el promotor *aprE*, por lo que tanto el nivel intracelular de DegU como su estado de fosforilación son importantes para la transcripción de proteasas extracelulares (Kobayashi; 2007).

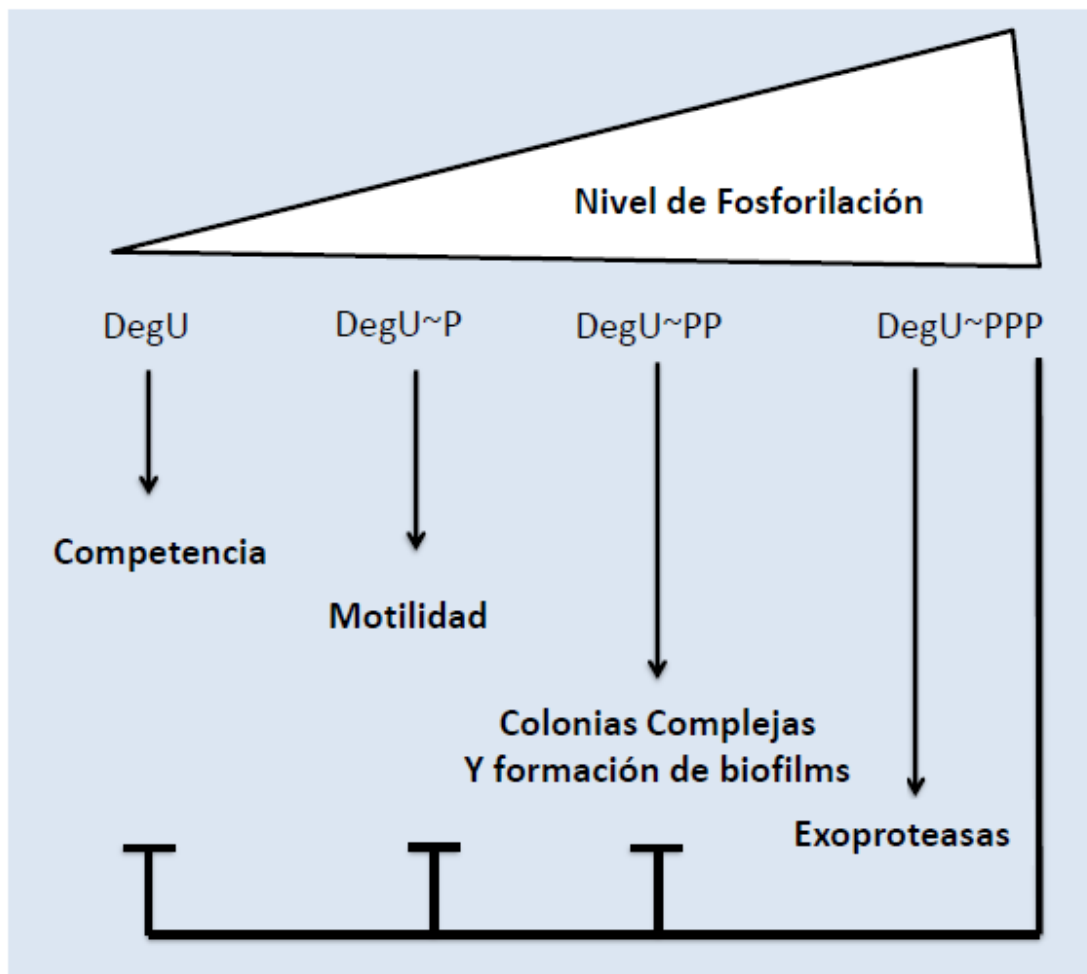


Figura 6. Modelo de regulación de DegU en la diferenciación celular en *B. subtilis*. Los fenómenos de competencia, motilidad, formación de biopelículas y producción de exoproteasas están regulados por el sistema DegU dependiendo de la concentración intracelular de la forma fosforilada de DegU, DegU~P (muy bajo nivel de fosforilación), DegU~PP (bajo nivel de fosforilación) y DegU~PPP (nivel alto de fosforilación). Las flechas y las barras en forma de T representan regulación positiva y negativa, respectivamente. Esquema adaptado de Verhamme y cols; 2007.

INTRODUCCIÓN

2.1.2 Función de Spo0A en esporulación, biopelículas y canibalismo

Spo0A es el regulador principal del proceso de esporulación. Este proceso está organizado de forma espacial, y comienza en la zona apical de las denominadas estructuras aéreas que forman las colonias de *B. subtilis*, posiblemente porque este es el lugar más alejado del medio y donde existe una menor concentración de nutrientes (Branda y cols; 2001). No todas las células de la población van a activar Spo0A (González-Pastor y cols; 2003; Chung y cols; 1994). Los genes que intervienen en el proceso de esporulación tienen una baja afinidad por Spo0A, por lo que para la activación de esta ruta se necesitan elevados niveles de Spo0A~P (Fujita y cols; 2005). La esporulación en *B. subtilis* se desarrolla en condiciones de estrés, falta de nutrientes o de oxígeno (Piggot y Hilbert; 2004), y además está regulada por *quorum sensing*. El pentapéptido PhrA se exporta al medio donde se acumula hasta alcanzar un determinado nivel y posteriormente se importa a través de la permeasa de oligopéptidos Opp (anteriormente se denominaba Spo0K), lo que produce una represión de la fosfatasa RapA mediante unión directa, que impide la desfosforilación de Spo0A. La inhibición de RapA mediante la formación del complejo PhrA-RapA produce una estabilización de la forma activa de Spo0A~P. Otros péptidos involucrados en *quorum sensing*, como PhrC, PhrB, PhrE también producen una estabilización de la forma fosforilada de Spo0A (Perego y Hoch; 1996; Perego y cols; 2001).

Bajo ciertas condiciones *B. subtilis* forma biopelículas, se observó que un mutante en *spo0A* es defectivo en su formación (Branda y cols; 2001). En estas comunidades una población de células se especializa en la producción de matriz y secretan EPS y la proteína TasA, que mantienen las células unidas. La transcripción de los genes que codifican estos componentes de la matriz está inducida por concentraciones bajas de Spo0A~P (Fujita y cols; 2005).

Por otra parte, se ha descubierto un comportamiento fraticida en las poblaciones de *B. subtilis*, donde miembros genéticamente idénticos de la población usan toxinas para matar a bacterias de la misma población. Este fenómeno se denominó canibalismo y, mediante este mecanismo, se consigue retrasar la esporulación gracias a la obtención de nutrientes a partir de las células muertas. El aporte de nutrientes al medio detiene

INTRODUCCIÓN

la ruta de esporulación en aquellas bacterias en las que no se ha llegado a un estado de esporulación sin retorno y les permite volver a duplicarse (Fig. 7) (González-Pastor y cols; 2003). La expresión de las toxinas implicadas en el canibalismo, Sdp y Skf, están positivamente reguladas por concentraciones bajas de Spo0A~P (Fujita y cols; 2005). En una población que empieza a esporular cuando entra en fase estacionaria, sólo un grupo de células expresa Spo0A activo y por tanto producen las toxinas y además son inmunes a las mismas, ocasionando la muerte selectiva de aquellas células que no tienen Spo0A activo. Se ha demostrado que la producción de toxinas y de matriz extracelular está ocurriendo en la misma subpoblación de bacterias, lo que indica que la población de productores de matriz podría crecer a expensas del resto de las células de la población mediante el fenómeno de canibalismo (López y cols; 2009).

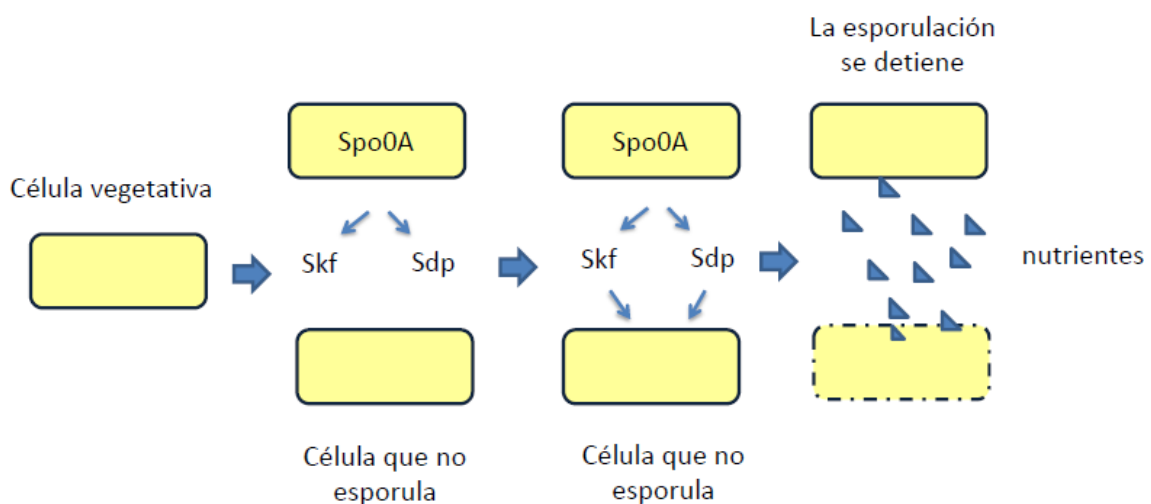


Figura 7. Modelo de canibalismo en *B. subtilis*. En condiciones de limitación de nutrientes se activa la ruta de esporulación, pero Spo0A sólo se activa en una parte de la población. Las células que expresan Spo0A van a producir, y resistir, las toxinas Skf y Sdp. Estas toxinas producen la muerte de las células que no expresan Spo0A. Como resultado la esporulación se detiene ante la presencia de nutrientes, que son utilizados para continuar su crecimiento. Esquema adaptado de González-Pastor; 2011.

2.1.3 Regulación de la competencia en *B. subtilis* mediante ComA

Mediante el fenómeno de competencia las células adquieren la capacidad de introducir DNA del ambiente e integrarlo en su genoma, proceso que promueve la variabilidad genética entre las poblaciones bacterianas. El estado de competencia se

INTRODUCCIÓN

produce al inicio de la fase estacionaria, como resultado de una determinada densidad poblacional, y el medio constituye un factor importante, siendo la competencia más alta en medios mínimos con presencia de glucosa (Dubnau; 1991; Dubnau; 1999).

El desarrollo de la competencia está inducido por mecanismos de *quorum sensing* por lo que se alcanza sólo a una determinada densidad celular. En la Fig. 8 se muestra un esquema con las rutas de regulación implicadas en el fenómeno de competencia. En el inicio de este proceso, están implicados la feromona ComX (Magnuson y cols; 1994) y el factor de la competencia y la esporulación (CSF) (Salomon y cols; 1996), ambos inducen la activación de ComA mediante su fosforilación. ComX estimula a la quinasa ComP y ésta induce la fosforilación de ComA (Salomon y cols; 1995), mientras CSF estimula la expresión de ComA, inhibiendo a la fosfatasa RapC, que es la encargada de desfosforilar e inhibirla (Salomon y cols; 1995). La feromona ComX actúa en la superficie celular, mientras que CSF se transporta activamente dentro de la célula mediante la oligopéptido permeasa Opp (Lazzazera y cols; 1997). Ambos van a inducir la fosforilación de ComA que en este estado activado, actúa como factor necesario para la transcripción del operón *srf-comS*, el cual codifica a las enzimas necesarias para la síntesis de surfactina (Nakano y cols; 1991) y a ComS, proteína responsable del inicio de la etapa tardía de la competencia y de la correcta actividad de ComK que codifica el sistema de transporte de DNA al interior de la célula (D'Souza y cols; 1994). Aunque el factor CSF es el péptido más conocido en la activación de ComA hay otros péptidos importados mediante la permeasa Opp, que actúan de forma similar, como son los péptidos PhrF, PhrG y PhrK (Autchung y cols; 2006; Hayashi y cols; 2006; Ogura y cols; 2003). Además el péptido PhrG está implicado en la regulación positiva de la actividad de DegU, mediante la inhibición de RapG (Ogura y cols; 2003). Todos estos péptidos están codificados en el mismo operón que una fosfatasa Rap (Kunst y cols; 1997) y cada Phr inhibe la actividad de la Rap con la que se cotranscribe, como resultado inducen la fosforilación del factor de transcripción ComA (Perego y cols; 1996, Solomon y cols; 2003).

La transcripción de los genes que codifican el sistema de transporte de DNA se induce mediante el factor de competencia ComK (van Sinderen y cols; 1995), y sólo se

INTRODUCCIÓN

produce en un 10-20% de las células de la población que son las que van a desarrollar el estado de competencia en *B. subtilis* (Dubnau; 1999; Avery; 2005). Este sistema de transporte está codificado por cinco *loci*: *comC*, *comE*, *comF*, *comG* y *nucA*. Las proteínas codificadas por el operón *comG* tienen una alta similitud con estructuras pili tipo IV de diversas especies (Hamoen 2003; Chung y cols; 1998). Las proteínas del operón *comC* contribuyen al correcto ensamblaje de la estructura (Hamoen y cols; 2005), el operón *comE* codifica para una proteína transmembrana que forma un poro en la membrana que guía el DNA hacia el interior, donde se asocia con la proteína DNA helicasa codificada por el operón *comF* (Londoño-Vallejo y Dubnau; 1994; Hamoen y cols; 2003). A la entrada en la célula, el DNA se digiere mediante la nucleasa NucA, produciendo fragmentos lineares (Provedi y cols; 2001). El DNA recién internalizado interactúa con la proteína RecA que induce la recombinación del DNA exógeno con secuencias homólogas en el cromosoma bacteriano (Haijema y cols; 1996).

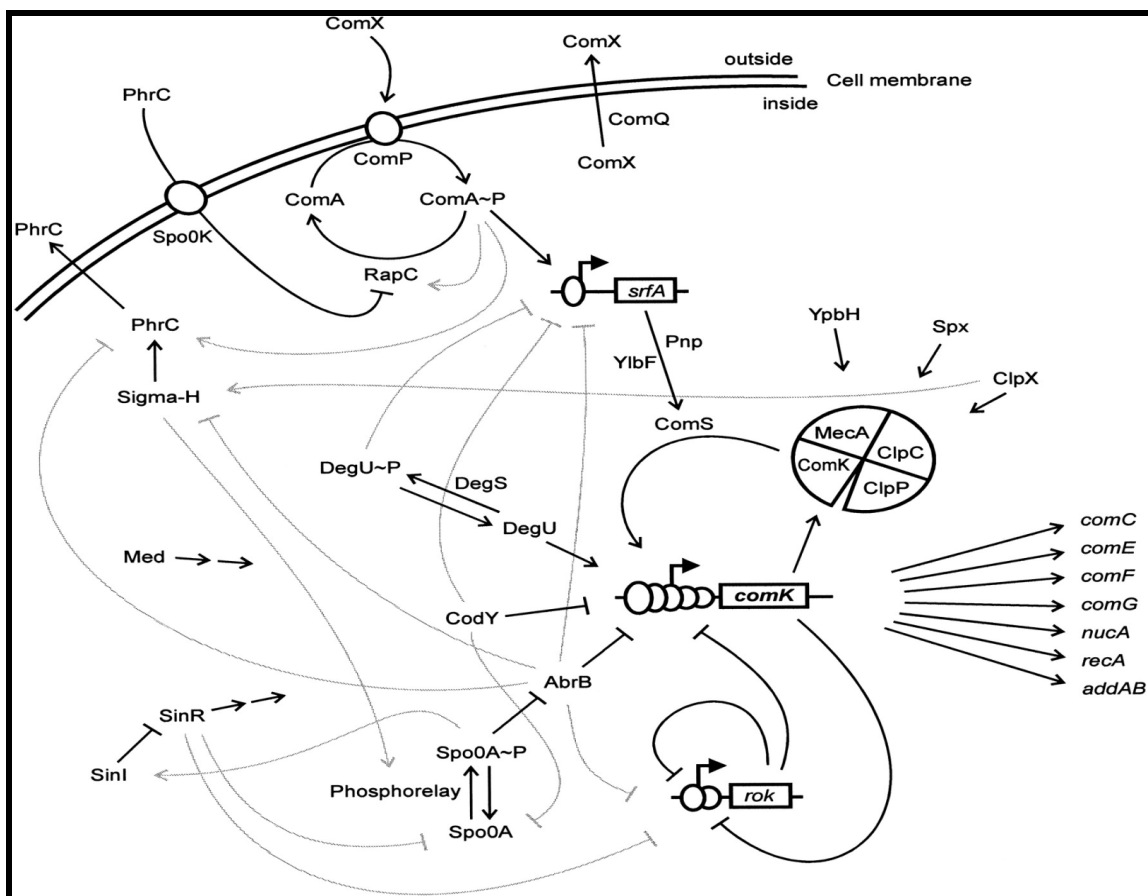


Figura 8. Esquema de las diferentes rutas de regulación involucradas en el desarrollo de la competencia. La ruta de competencia se indica mediante líneas negras, las líneas grises indican conexiones con otras rutas de regulación que actúan en *B. subtilis*. Las flechas y las barras en forma de T representan regulación positiva y negativa, respectivamente. (Hamoen y cols; 2003)

INTRODUCCIÓN

2.2 Diferencias fenotípicas entre cepas salvajes y domesticadas en *B. subtilis*

Diversas cepas de *B. subtilis* han sido utilizadas de forma extensa en laboratorios de todo el mundo como modelo de investigación de mecanismos de regulación génica, diferenciación y metabolismo (Sonenshein y cols; 2002). Esto ha ocasionado la selección de determinadas características beneficiosas para su empleo en el laboratorio. Por ejemplo, la estirpe de laboratorio 168 exhibe una mayor competencia (Nakano y cols; 1991; D'Souza y cols; 1994; Lopez y Kolter; 2010), pero ha perdido funciones y características que perduran en las estirpes denominadas “no domesticadas”, cuyo uso ha sido menos extenso. Como ejemplo de esas diferencias, se ha observado en la estirpe no domesticada NCBI 3610 la habilidad de formar biopelículas robustos que producen cuerpos aéreos, y tiene una morfología de colonia compleja, diferente de la formada por estirpes de laboratorio (Branda y cols; 2001) y además presenta un tipo de movilidad social denominado swarming (Kearns y Losick; 2003). NCBI 3610 desciende de la estirpe identificada y descrita por Ferdinand Cohn, que posteriormente fue genéticamente manipulada para producir la estirpe 168 y sus derivados, usados mayoritariamente en los laboratorios (Burkholder y Giles; 1947).

2.3 Antecedentes de la producción de eDNA en *B. subtilis*

Los primeros trabajos que identificaron la existencia de eDNA en cultivos *in vitro* de *B. subtilis* fueron realizados por Crabb y cols; 1977 y Borestein y Ephrati-Elizur; 1969 y ya sospecharon la existencia de una relación del fenómeno con la competencia. Lorenz y cols; 1991 identificaron que existía una liberación de eDNA al medio en cultivos de *B. subtilis* 168. Observaron que existía una producción de eDNA asociada a lisis en la fase estacionaria y otra no asociada a lisis en la fase exponencial, la concentración que midieron era de aproximadamente $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ y determinaron que existía una coincidencia entre la secreción específica de DNA en la fase exponencial y el máximo de competencia en el cultivo

INTRODUCCIÓN

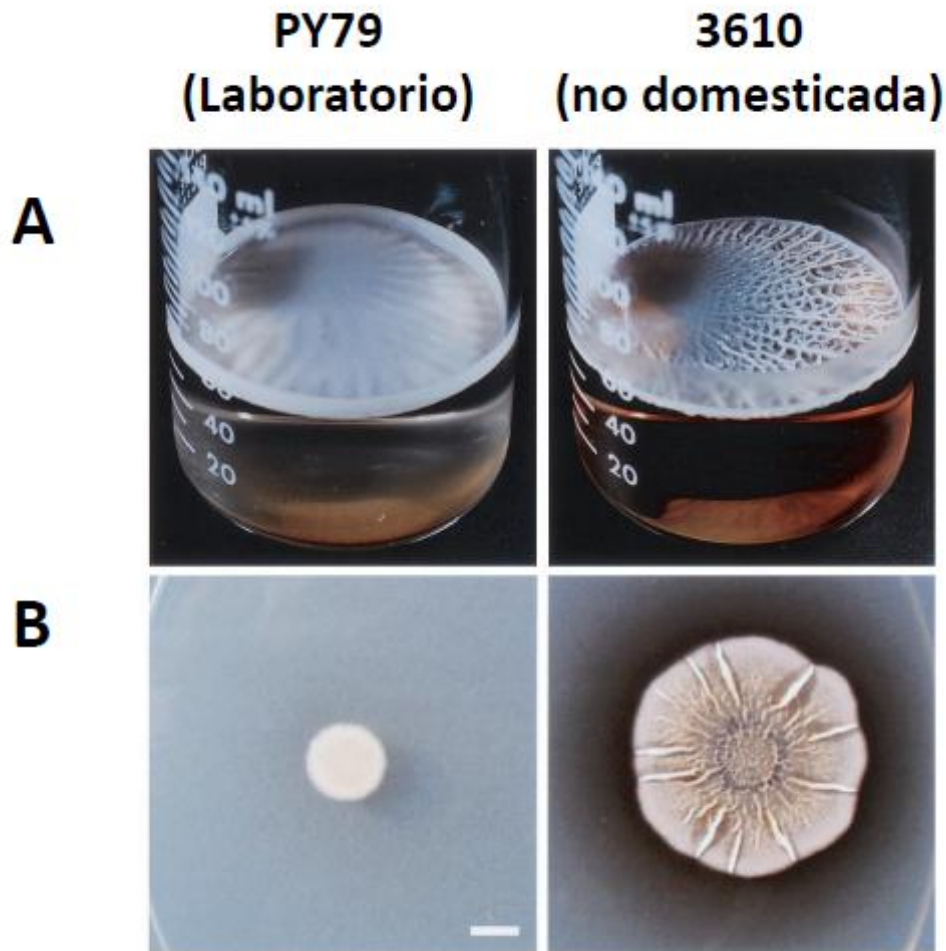


Figura 9. Diferencias fenotípicas entre la estirpe de laboratorio PY79 y la estirpe no domesticada 3610. A) Formación de biopelículas de cultivos de las estirpes PY79 y 3610. Los cultivos fueron realizados en MSgg. B) Colonias formadas por las estirpes PY79 y 3610 en MSgg sólido tras su incubación a 30° C durante 48 h. La barra representa 5 mm. (Branda y cols; 2001)

Por otro lado, en un trabajo más reciente, se determinó que la estirpe de laboratorio 168 segregaba al medio eDNA en fragmentos de dos tamaños: 13 kb y de aproximadamente 50 kb, e identificaron que mutaciones en genes del profago PBSX (*xkdG*, *xkdK* y *xkdM*) producían una reducción de la liberación de eDNA (Shingaki et. al; 2003). En este estudio no se relacionaba el fenómeno con la competencia.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de producción de eDNA en *B. subtilis* se han realizado utilizando las estirpes de laboratorio. Como ya hemos visto anteriormente, el trabajo con cepas de laboratorio impiden un conocimiento exacto de las características de la bacteria en la naturaleza, por lo que nos planteamos realizar el estudio de la producción de eDNA en la estirpe “no domesticada” 3610.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es estudiar la producción de eDNA en la cepa no domesticada de *B. subtilis* 3610. Este objetivo se divide en los siguientes subobjetivos:

1. Caracterización de la producción de ADNe en *B. subtilis*
 - a. Fase de crecimiento en que se libera al medio.
 - b. Composición génica.
 - c. Mecanismo de secreción.
2. Búsqueda de genes implicados en la producción de eDNA.
3. Estudio de la ruta de regulación que induce la liberación de eDNA al medio.
4. Identificar la función que tiene el eDNA en *B. subtilis* 3610.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en las tablas 1 y 2.

Cepas	Genotipo	Referencia
NCIB3610	silvestre	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center
PY79	<i>swrA srf</i>	P. Youngman
1A792	168 <i>lytABC::neo lytD::tet lytE::cam lytF::spc</i>	BGSC, nº 1A792 (Margot y cols; 1999)
Bal 941	JH646 <i>ΔphrC::tet</i>	Lanigan-Gerdes y cols; 2007
BD1243	168 <i>comA::tn917-erm</i>	Roggiani y cols; 1990
BD1245	168 <i>ΔcomEA::tn917-erm</i>	Inaminey cols; 1995
PG677	168 <i>ΔcomK::kn</i>	Van Sinderen y cols; 1995
PG679	168 <i>ΔcomGA::erm</i>	colección de P.Graumann
EG168	PY79 <i>skfABCDEF::tet</i>	Gonzalez-Pastor y cols; 2003
EG240	3610 <i>spo0A::erm</i>	este trabajo
EG245	3610 <i>srfAA::erm</i>	Branda y cols; 2001
EG385	3610 <i>amyE::Pfeu-lacZ-spc</i>	colección de laboratorio
EG524	PY79 <i>sdpABC::erm</i>	Gonzalez-Pastor y cols; 2003
RL891	PY79 <i>spo0A::erm</i>	Branda y cols; 2001
GP229	3610 <i>degU::mini Tn10</i>	este trabajo
GP230	3610 <i>comP::mini Tn10</i>	este trabajo
GP231	3610 <i>topA::mini Tn10</i>	este trabajo
GP232	3610 <i>mfd::mini Tn10</i>	este trabajo
GP233	3610 <i>oppA::mini Tn10</i>	este trabajo
GP236	3610 <i>ΔphrC::tet</i>	este trabajo
GP237	3610 <i>ΔcomK::kn</i>	este trabajo
GP239	3610 <i>ΔcomGA::erm</i>	este trabajo
GP240	3610 <i>comA::tn917-erm</i>	este trabajo
GP241	3610 <i>ΔcomEA::tn917-erm</i>	este trabajo
GP304	3610 <i>nos::erm</i>	Schreiber y cols; 2011
GP305	3610 mutante espontáneo	este trabajo (SPR-1)
GP306	3610 mutante espontáneo	este trabajo (SPR-2)
GP307	3610 mutante espontáneo	este trabajo (SPR-3)
GP309	3610 <i>comP-comX::Tn10</i>	este trabajo
GP310	3610 <i>oppF::Tn10</i>	este trabajo
GP311	3610 <i>yqhG::Tn10</i>	este trabajo
GP313	3610 <i>lytABC::neo</i>	este trabajo
GP314	3610 <i>lytE::cam</i>	este trabajo
GP315	3610 <i>skfABCDEF::tet sdpABC::erm</i>	este trabajo
GP316	3610 <i>ΔxkdG::erm</i>	este trabajo
GP319	3610 mutante espontáneo	este trabajo (SPR-4)
GP387	3610 <i>sigD::cat</i>	este trabajo
GP388	3610 <i>hag::erm</i>	este trabajo
GP389	3610 <i>phrF::mIs</i>	este trabajo
GP390	3610 <i>phrK::spc</i>	este trabajo
GP391	3610 <i>phrG::km</i>	este trabajo

Tabla 1: Cepas de *B. subtilis* usadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-</i> <i>1 hsdR17</i>	Invitrogen

Tabla 2: Cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo.

1.2 Plásmidos utilizados en este trabajo

Las características de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran a continuación (Tabla 3).

Vector	Marcador/Utilidad	Referencia
pDG646	Derivado del plásmido pSB119. Se utiliza para construcción de mutantes por LFH-PCR. Porta secuencia <i>Er^R</i>	Guerout-Fleury y cols; 1995
pDG1726	Derivado del plásmido pSB119. Se utiliza para construcción de mutantes por LFH-PCR. Porta secuencia <i>Spc^R</i>	Guerout-Fleury y cols; 1995
pDG780	Derivado del plásmido BluescriptKS ⁺ . Se utiliza para construcción de mutantes por LFH-PCR. Porta secuencia <i>Km^R</i>	Guerout-Fleury y cols; 1995
pBluescript	Vector de clonaje derivado de pUC19. Contiene el MCS dentro del fragmento α del gen β galactosidasa. Ap ^R	Stratagene
pIC333	Vector termosensible que porta secuencia miniTn 10. Usado para construir la biblioteca de transposición en <i>B. subtilis</i> 3610. <i>Er^R</i> , <i>Spc^R</i> .	Steinmetz y cols; 1994

Tabla 3: Vectores utilizados en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.3 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Lo siguientes oligonucleótidos (tabla 4) fueron usados de cebador durante el desarrollo de este trabajo.

Primer	Secuencia
P1 xkdG	cacttgaggagtggccggagg
P2 xkdG	attatgtcttttgcgcagtcggc caattgatttcctcctcttgact
P3 xkdG	cattcaattttgagggttgccag acgaggtggtcagctcatgctc
P4 xkdG	cccacctcaagcgaagcccg
P1 phrF	tatgaaggaggaggattgcaaacg
P2 phrF	attatgtcttttgcgcagtcggc agtaatagtttagacttcaatttcatac
P3 phrF	cattcaattttgagggttgccag ttaaccgccgtccatcggcgg
P4 phrF	tgtcatggcctgtcattaaagcga
P1 phrK	aatgactatgttatgattgttttcgag
P2 phrK	acatgtattcacgaacgaaaatcg agctttgcgtatctattttagctgtg
P3 phrK	atttagaaaacaataaaccttgc agttgattaattaatttagccctactca
P4 phrK	tgattactcacaatttcacgtgag
P1 phrG	actatcagaataagcaactgagattg
P2 phrG	tacctatcacctcaaatggttcgt gcgacgcctgcgccaatcag
P3 phrG	ctaattcttttctgaagtacatccg caatttaacgaaagaatcctaaaacg
P4 phrG	tcattctttgtataacccgcatagg
M-13	gtaaaacgacggccagtg
M13-reverse	ggaaacagctatgaccag
My050	gccgattcattaatgcagg
My051	cccacttataaacaagatc

Tabla 4: Oligonucleótidos usados en este trabajo. Los nucleótidos en negrita indican secuencia que hibrida con secuencia de los genes de resistencia a antibióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.4 Medios de cultivo y antibióticos

Todos los medios de cultivo y soluciones fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave a 120°C y a 1 atmósfera de presión. Los antibióticos y las soluciones que no se pueden autoclavar, se esterilizaron por filtración en condiciones de esterilidad utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore).

El crecimiento de cepas de *B. subtilis* y *E. coli* en medio líquido rico se realizó en Luria-Bertani (LB) (1% Bacto tristona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl).

Para el análisis de la producción de eDNA al medio extracelular en *B. subtilis* se ha utilizado Medio Mínimo (MSgg): 5 mM tampón fosfato pH 7, 0,1 M MOPS pH7, 5 µM FeCl₃, 2 mM MgCl₂, 0,7mM CaCl₂, 50 µM MnCl₂, 1 µM ZnCl₂, 2 µM tiamina, 50 µg ml⁻¹ fenilalanina, 50 µg ml⁻¹ triptófano, 50 µg ml⁻¹ treonina, 0,5% glicerol y 0,5% glutamato (Freese; 1979).

Para la transformación de cepas de *B. subtilis* se ha utilizado Medio de Competencia Modificado (MCM) (100 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄ (pH 7), 2% glucosa, 30 mM citrato trisódico, 200 mg ml⁻¹ citrato férrico-amónico, 0,1% hidrolisado de caseína, 0,2% glutamato potásico) Spizizen; 1958. La concentración final de antibióticos utilizada es: 5 µg ml⁻¹ cloramfenicol, 100 µg ml⁻¹ espectinomicina, 2 µg ml⁻¹ kanamicina, 1 µg ml⁻¹ eritromicina 25 µg ml⁻¹ lincomicina (mls), 50 µg ml⁻¹ tetraciclina y 7 µg ml⁻¹ neomicina.

Se emplearon placas de DSM para estimar diferencias en la producción de surfactina de las distintas cepas de *B. subtilis* (Bactonutrient Difco, 10% KCl, 1,2% MgSO₄, 1M NaOH, 1M Ca(NO₂)₂, 0,01M MnCl₂, 1mM FeSO₄, 1,5% de agar).

Para el crecimiento en medio sólido se utiliza medio LB suplementado con 1,5% Bacto agar. Antes del uso, las placas de LB se secan durante 16 h a temperatura ambiente.

Para seleccionar recombinantes por actividad β-galactosidasa se añadió X-Gal (Duchefa) en la placa de selección, a una concentración final de 40 µg ml⁻¹.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MÉTODOS

2.1 Manipulación y condiciones de cultivos bacterianos

En medio líquido, las cepas de *B. subtilis* se cultivan a 30°C con agitación durante al menos 12 horas y posteriormente se inoculan en medio fresco y se incuban a 37°C con agitación de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se incuban en LB a 37°C en estufa durante al menos 12 horas. Para analizar la morfología de las colonias de las diferentes cepas, las bacterias son aisladas desde cultivo sólido con asa de platino en placa nueva en medio LB.

2.1.1 Conservación de las cepas bacterianas

La conservación a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de LB y antibiótico apropiado a temperatura ambiente (máximo una semana). La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 20% de glicerol a -80°C.

2.1.2 Condiciones de cultivo planctónico para la producción de eDNA en *B. subtilis*

Los cultivos se crecen en medio MSgg. Se inicia el cultivo a $A_{600nm}=0,05$, a lo largo del cultivo se extraen muestras de 0,8 ml y se centrifugan (5 min a 5000 rpm en una centrífuga Eppendorf modelo 5415D). Se guardan 0,5 ml de sobrenadante a -80°C para su posterior precipitación y análisis. Se toman muestras de esta manera hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria.

En caso de los mutantes *spo0A* and *srfAA*, adicionalmente se filtra el cultivo tras la centrifugación con filtros de 0,45 µm de Millipore.

2.1.3 Transformación bacteriana

2.1.3.1 Transformación de células no competentes, *E. coli*

Para inducir la competencia de *E. coli* DH5-α se sigue el método de Inoue y cols; 1990. Para ello, se inoculan desde placa, células de *E. coli* en 100 ml de LB y se crecen a 37° C y 200 rpm de agitación hasta que el cultivo entre en fase exponencial (aproximadamente una $A_{600nm}= 0,6$). A continuación se incuba en hielo durante 30 minutos, se centrifuga y se resuspende en 100 mM CaCl₂ enfriado a 4°C. Se guardan las células a -80°C con glicerol 10%. Para la realización de transformaciones mediante

MATERIALES Y MÉTODOS

tratamiento térmico de *E. coli* se sigue el método de Hanahan, 1983 con las siguientes modificaciones: 200 µl de células competentes se incuban con 10-100 ng del DNA que se quiere transformar durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se transfiere a un termobloque a 42°C durante 1 minuto 30 segundos, y se colocan en hielo durante 2 minutos. A continuación se añaden 850 µl de LB y se incuban durante 2 horas a 37°C y agitación 200 rpm. Se pone un control negativo sin añadir DNA a las células. Finalmente se extiende un volumen apropiado en placas sólidas de LB y el antibiótico correspondiente.

Se utilizan alícuotas de células *E. coli* DH5α comerciales (Invitrogen) para realizar transformaciones mediante electroporación. Previamente a la electroporación, se dializa el DNA a transformar (10 µl) para eliminar las sales. Para ello, se utilizan filtros 0,025 µm VSWP (Millipore). Se añade 1 µl de DNA a 20 µl de células electrocompetentes. Posteriormente se transfiere a cubeta de electroporación de 1 mm (Eppendorf) y se aplica un pulso de 1,8 kV en el electroporador (Biorad MicroPulser). Inmediatamente se añade medio rico SOC (Invitrogen). Se lleva un control negativo añadiendo a las células sólo vector sin inserto. Finalmente se incuba durante 2 horas a 37°C a 200 rpm y se inoculan en placas sólidas de LB con el antibiótico apropiado.

2.1.3.2 Transformación de células competentes de *Bacillus subtilis*

La cepa de laboratorio *Bacillus subtilis* PY79 es competente natural, sin embargo la cepa natural 3610 se creía que no lo era pese a tener todos los genes de competencia. En nuestro laboratorio hemos conseguido transformarla de forma natural con el mismo protocolo que usamos para PY79, salvo que la eficiencia es de dos órdenes de magnitud menor en la cepa natural con respecto a la de laboratorio.

Para la transformación de *Bacillus subtilis* se incubaba un preinóculo en medio líquido LB el día anterior. La elección de LB como medio de crecimiento para el preinóculo se debe al aumento de la eficiencia de competencia que hemos observado y que creemos que se debe a la presencia de extracto de levadura tal como describió Spizizen; 1958. Tras crecer toda la noche en LB se transfiere a MCM sin lavado intermedio y se inicia el

MATERIALES Y MÉTODOS

cultivo a $A_{600nm}=0,07$. Al comienzo de la fase estacionaria ($A_{600nm}= 1,5 - 2$), se añaden 10 μ g de DNA genómico a 1 ml de cultivo. El cultivo se incuba al menos 2 horas a 37°C con 200 rpm de agitación. Se pone control negativo sin adicción de DNA. Posteriormente se distribuyen diferentes volúmenes del cultivo en placas de LB con el antibiótico apropiado.

2.1.4 Formación de biopelículas en *B. subtilis*

La formación de biopelículas de las diferentes cepas de *B. subtilis* estudiadas se realizó en placas multipocillo en MSgg. El cultivo se inicia a una $A_{600nm}=0,1$. Se incuban a 37°C sin agitación durante 40 horas en total y se observa su formación a lo largo del tiempo. En este estudio con distintos mutantes se han realizado tres réplicas.

2.1.5 Análisis de la viabilidad bacteriana

La viabilidad bacteriana se ha determinado mediante diluciones seriadas. Sobre placas de LB, se extendieron 100 μ l de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , se contaron el número de colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonia (UFC). Por otro lado, se utilizó la tinción fluorescente *BacLight dye* (Molecular Probes) para determinar el porcentaje de células muertas. Se ha realizado siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la visualización de las células se ha usado el microscopio de fluorescencia Leica CTR 6000. Se contaron un mínimo de 500 células en cada muestra para determinar el porcentaje de células muertas. Se han hecho tres réplicas de este experimento.

2.2 Aislamiento de ácidos nucleicos

2.2.1 Cuantificación de la concentración de eDNA en cultivos planctónicos de *B. subtilis*

Se precipita el eDNA de 0,5ml del sobrenadante con acetato sódico y etanol y finalmente se resuspende en 20 μ l de agua miliQ (Sambrook y Russel; 2001). La concentración del eDNA se determina mediante espectrofotometría (A_{260}/A_{280}) (Espectrofotómetro S2100 Diode Array, WPA Biowave). Para el análisis de la producción de eDNA de los diferentes mutantes estudiados, se han realizado al menos tres réplicas de cada experimento, utilizándose como control la estirpe silvestre 3610.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.2 Aislamiento y cuantificación de DNA cromosómico de *B. subtilis*

El aislamiento de DNA se realiza usando el kit “Wizard® genomic DNA purification kit”. Previamente se rompe la pared celular resuspendiendo las células provenientes de 1 ml de cultivo en 50 mM EDTA y 1,2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ lisozima, posteriormente se utilizan los reactivos del kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se precipita con isopropanol, se lava con etanol 70% (Sambrook y Russel; 2001) y se resuspende en 100 μl de agua miliQ. Para determinar la concentración se utiliza un espectrofotómetro S2100 Diode Array (WPA Biowave).

2.2.3 Aislamiento y cuantificación de DNA plasmídico de *E. coli*

El aislamiento de DNA plasmídico se realiza usando el protocolo “Qiapreps® spin miniprep kit” (Qiagen), partiendo de 3 ml de cultivo en LB y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este DNA se utilizó para reacciones de secuenciación, clonaje y mutagénesis mediante LFH-PCR. Para determinar la concentración de DNA plasmídico se usa un Nanodrop (Nanodrop® ND-1000).

2.2.4 Aislamiento y cuantificación de RNA de *B. subtilis*

Se extraen 25 ml de cultivo (en el momento previo al máximo de producción de eDNA) de estirpes de *B. subtilis* crecidas en MSgg. Se centrifuga el cultivo a 4°C y se aísla el RNA del sedimento celular por el procedimiento de extracción con fenol ácido caliente (Fawcett y cols.; 2000). Cada muestra de RNA se analiza en gel de agarosa 0,8% para garantizar la integridad de las bandas de 23S y 16S del RNAr y se mide su concentración mediante espectrofotometría.

2.3 Técnicas de biología molecular

2.3.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Roche). Generalmente, las reacciones contienen entre 3-10 μg de DNA, 0,1 volúmenes de la solución tampón suministrada por el fabricante y 0,01-10 unidades de enzima de restricción, en volúmenes finales de reacción entre 25-50 μl . Las digestiones de inserto se llevaron a cabo incubando entre

MATERIALES Y MÉTODOS

1-4 horas, los vectores se digieren al menos durante 12 horas; las temperaturas de incubación y de inactivación de las enzimas son las indicadas por el fabricante.

2.3.2 Defosforilación de extremos 5' del DNA con fosfatasa alcalina

Para aumentar la eficiencia del clonaje del eDNA, se desfosforilaron los extremos del vector linearizado. Para ello, se utilizan 10 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para inactivar la reacción enzimática se añaden 2 μ l EDTA 0,05 M pH 8,0, 5 μ l 10% SDS, 0,5 μ l proteinasa K 10 mg ml⁻¹ y se incuba 15 minutos a 65°C.

2.3.3 Ligación de DNA

La ligación entre el vector linearizado y el inserto, obtenidos mediante digestiones en sitios compatibles, se incuban en proporción 1:5. Se utiliza 0,1 volúmenes de tampón y 1 unidad de DNA ligasa T4 (Roche) en un volumen final de 10 μ l, siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla se incuba a 16°C durante al menos 12 horas.

2.3.4 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

Las condiciones aplicadas a las reacciones de PCR son las siguientes: se utiliza 1 unidad de DNA polimerasa de *Termus aquaticus* (Taq) (Roche), 0,1 volúmenes de tampón 10X suministrado por la casa comercial, 4 mM de Cl₂Mg, 0,125 mM de una mezcla igualada de dNTP y 20 pmol de cada oligonucleótido, en un volumen final de 25 μ l. La cantidad de DNA molde que se utiliza es de 20-70 ng. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y cols; 1994, usando 4°C por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores para la fase de hibridación y se calcula un tiempo de síntesis de 1 minuto por cada 1 Kb. La fórmula para calcular la temperatura de desnaturalización de cada oligonucleótido es:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Para la realización de “PCR-synthesis of disruption cassettes with long flanking homology (LFH-PCR)” (Watch; 1996) se realizan tres rondas de PCR con las siguientes modificaciones:

MATERIALES Y MÉTODOS

Primera PCR: Mismas condiciones que una PCR estándar pero se utiliza 1 unidad de polimerasa Pfu turbo® (Stratagene). El volumen final de la reacción es de 50 µl.

Segunda PCR temprana: Se utiliza el kit “*Expand long template PCR system*” (Roche). Se utilizan 200 ng de DNA molde, 100 ng de cebadores, el tampón 3 suministrado por el fabricante, 0,125 mM de una mezcla igualada de dNTP y 1 unidad de DNA polimerasa *Expand*. El volumen final es de 50 µl.

Segunda PCR tardía: Se usan las mismas condiciones que en la anterior PCR, salvo que se usa 1 µl de la reacción anterior como molde, el tampón 2 del mismo kit de Roche y 0,4 µM de cada oligonucleótido.

El ciclo de PCR usado para la segunda PCR, tanto la temprana como la tardía, es el siguiente:

94°C 2 minutos

10 ciclos: 94°C 30 segundos

63°C 30 segundos

68°C 8 minutos

20 ciclos: 94°C 30 segundos

63°C 30 segundos

68°C 8 minutos + 20 segundos extra para cada uno de los ciclos

68°C 10 minutos

2.3.5 Electroforesis de DNA y RNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó rutinariamente en geles de agarosa 0,8% (p/v) (Pronadisa), preparados en tampón TBE (Tris-Borato 45 mM, 1 mM EDTA) (Conda). Como patrón de peso molecular se utiliza el marcador

MATERIALES Y MÉTODOS

Hyperladder I (Bioline). Para cada muestra a analizar se añade un décimo de tampón de carga 10X (TBE 10X, 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol).

Para la recuperación de fragmentos de DNA en los geles se utilizó kit “*Qiaquick® gel extraction kit*” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.6 Secuenciación de DNA

Las muestras de DNA se secuenciaron de forma automática mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger y cols; 1977). Ésto se llevó a cabo en la unidad de secuenciación del Centro de Astrobiología (Madrid).

2.4 Análisis de actividades enzimáticas

2.4.1 Análisis de la actividad DNasa del sobrenadante de 3610

Se extraen 25 µl de sobrenadante de cultivo de *B. subtilis* 3610 en MSgg a diferentes puntos del crecimiento y se incuban con 2 µg de marcador de peso molecular III (Roche) a 37° C durante 1 h. Al mismo tiempo se incubaba un control de 25µl de MSgg estéril con 2 µg de marcador de peso molecular III (Roche). Tras la incubación, se analiza 5 µl de cada una de las muestras en gel de agarosa para determinar si existe degradación en la muestra, y por lo tanto presencia de DNasas en el sobrenadante de 3610. Se han realizado dos réplicas de este experimento.

2.4.2 Ensayos con DNasa I y Nucleasa S1

Se realiza un tratamiento del eDNA con las enzimas DNasa I y Nucleasa S1 para determinar si el eDNA es de cadena doble o simple. Para ello, se incuban 6 µg de eDNA de *B. subtilis* con 10 unidades de DNasa I recombinante libre de RNasa (Roche), Tris HCl 25 mM pH 8 y 50% glucosa a 37° C durante 1 h, o con 160 unidades de Nucleasa S1 y su tampón (Amersham Pharmacia Biotech) a 37° C durante 1 h. En ambos casos se ha puesto un control negativo con las mismas condiciones pero sin la enzima y, finalmente, cada muestra se ha analizado en gel de agarosa para determinar el grado de degradación de la muestra. Se han hecho tres réplicas de este experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.3 Ensayos de actividad β -galactosidasa

Los ensayos de actividad β -galactosidasa se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Harwood y Cutting; 1990). Se ha medido la actividad β -galactosidasa intracelular y extracelular, y el porcentaje de la actividad β -galactosidasa se ha referido a la actividad total (intracelular más extracelular).

Se han realizado tres réplicas de este experimento.

2.5 Clonaje del eDNA de *B. subtilis*

La estirpe *B. subtilis* 3610 se cultivó en las condiciones que se explican en apartado 1.2. Se extrae 10 ml en el punto máximo de producción de eDNA y se centrifuga (5 min a 5000 rpm en centrífuga Eppendorf 5415D). Se tratan 6 ml del sobrenadante con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1, pH 8) y posteriormente se precipita con acetato sódico y etanol (Sambrook y Russel; 2001).

A continuación, se digieren 3 μ g de eDNA con *SauIII*A (Roche). Se seleccionan fragmentos de tamaño entre 400 a 3.000 pb y se purifican con el kit QiaQuick (Qiagen). Al mismo tiempo, 10 μ g de pBluescript SK (+/–) se digiere con *Bam*HI (Roche) y se desfosforila el extremo 5'. El vector se purifica con acetato sódico/etanol (Sambrook) y posteriormente se procede a la ligación del inserto y del vector y a la electroporación en células competentes *E. coli* DH5- α . Los clones recombinantes se secuencian usando los cebadores universales M13 y M13-reverse. La identificación de la secuencia se realizó mediante el servidor Subtilist (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) y la herramienta de BLAST (Altschul y cols; 1997).

2.6 Construcción de mutantes

Las deleciones de los genes *xkdG*, *phrF*, *phrK*, *phrG* del genoma de *B. subtilis* 3610 se han realizado mediante la técnica de *long-flanking homology polymerase chain reaction* (LFH-PCR) (Watch; 1996). Las deleciones/inserciones se construyen mediante la amplificación por PCR (condiciones indicadas en el apartado de PCR) de aproximadamente 1 Kb desde el extremo 5' del gen con los oligonucleótidos P1 y P2, mientras otra banda de aproximadamente 1 Kb desde el extremo 3' es amplificada

MATERIALES Y MÉTODOS

usando los cebadores P3 y P4 (la descripción de la secuencia de cada oligonucleótido se encuentra en la tabla 4). Los productos resultantes se purifican desde un gel de agarosa 0'8%. Los productos de PCR resultantes son usados como cebadores para amplificar el gen de resistencia a antibiótico elegido (Fig. 10).

Esto produce una delección completa del gen y sustitución por un gen de resistencia. Los productos de PCR se transforman inicialmente en la cepa PY79 debido a su mayor eficiencia de transformación. Finalmente, la mutación se introduce en la estirpe 3610 por transformación natural usando DNA cromosómico y se comprueba de nuevo por PCR. Los plásmidos que portan los genes de resistencia están presentados en la tabla 3.

Otros mutantes analizados en este estudio han sido donados por otros laboratorios. Para introducir la mutación a la estirpe de *B. subtilis* 3610 se extrae previamente el DNA cromosómico y se transforma en *B. subtilis* 3610 como se ha descrito anteriormente.

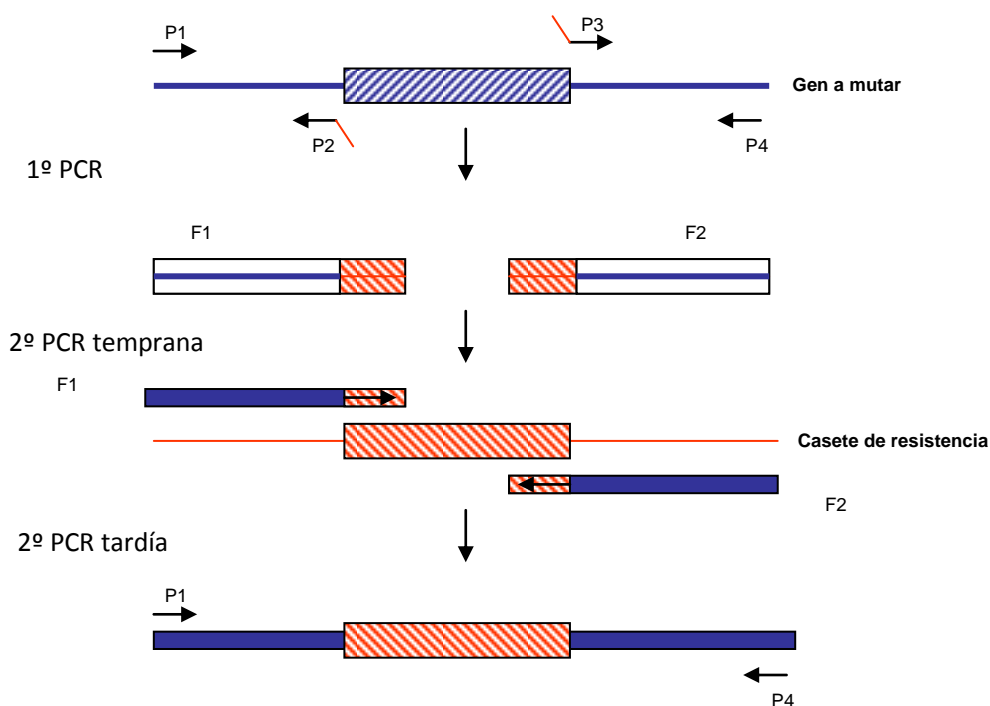


Figura 10: Esquema explicativo de la mutagénesis mediante técnica LFH-PCR. Esquema adaptado de Watch; 1996.

2.7 Construcción de una biblioteca de transposición en 3610

Para realizar la construcción de la biblioteca de transposición se utiliza la estirpe DS1010 (Kearns y cols; 2004). Esta estirpe es un derivado de *B. subtilis* 3610 que porta el transposón mini-Tn10 en el vector termosensible pIC333 (Petit y cols; 1990; Steinmetz y Ritcher; 1994). La biblioteca se ha generado como describe Kearns y cols; 2004. Se inocula la estirpe DS1010 en LB con espectinomicina y se incuba durante 16 h a 22°C. A continuación, se diluye el cultivo 20 veces en medio fresco y se incuba a 37°C durante 4 h. Posteriormente, se transfiere el cultivo a placas de LB con espectinomicina. Para identificar las inserciones de transposición, se digieren 4 µg de DNA cromosómico de DS1010 con *Hind*III durante 4 h a 37°C. Posteriormente, las reacciones purificadas fueron religadas en 200 µl a 15°C durante 16 h. Las ligaciones se purificaron por filtración en tubos microcon (Millipore) y se transformaron por choque térmico en *E. coli* DH5α (condiciones descritas en apartado 1.3.1). Finalmente, cada clon seleccionado fue secuenciado usando cebadores My050 y My051 (Kearns y cols; 2004). La identificación de la secuencia se realizó usando la base de datos SubtiList (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) y la herramienta bioinformática BLAST (Altschul y cols; 1997).

2.8 Microarrays de DNA

Para la construcción del microarray de DNA, se utilizaron 4128 oligonucleótidos de 65 nucleótidos cada uno (SIGMA-Genosys), de los cuales 4106 se corresponden con genes presentes en *B. subtilis* y 22 son controles. Los oligonucleótidos se imprimieron en soportes de cristal Corning® UltraGAPS™, recubiertos de gamma amino propilsilano (GAPS) (Britton y cols; 2002).

2.8.1 Preparación de DNAc marcado con fluorescencia

Las sondas de DNAc se prepararon mediante la retrotranscripción del RNA total de cultivo de *Bacillus subtilis* e incorporando directamente dUTP marcado con fluoróforos Cy3 o Cy5 al DNAc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para su marcaje, se incubó el RNA total (30 µg) con 1µg de hexámeros aleatorios a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente se realiza la retrotranscripción con las siguientes condiciones: 0,2 volúmenes de tampón suministrado por el fabricante, 5 mM MgCl₂, 20 mM ditioneitol, deoxinucleósidos trifosfato (1mM dATP, 1mM dGTP, 1mM dCTP, 0,4mM dTTP) y Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (GE Healthcare), se añade 1 unidad de Super Script II retrotranscriptasa inversa (Invitrogen), y la mezcla se incubó durante 2 h a 42°C. La reacción se para incubando 15 minutos a 70°C. Se purifica la muestra usando el kit de purificación de productos de PCR, QiaQuick (Qiagen). Finalmente, las sondas se resuspenden en el tampón de hibridación (25 mM HEPES (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,8 µg de RNAt de levadura, 3X SSC, 0,2% sulfato de sodio). La hibridación de los microchips de DNA se lleva a cabo mediante protocolo descrito por Eisen y cols; 1999.

2.8.2 Hibridación de sondas de eDNA y DNA cromosómico

Se hibrida el microarray con sondas de eDNA y DNA cromosómico procedente de 3610. Se marcan 2 µg de cada uno mediante transcripción con la enzima Klenow (Biolabs) incorporando directamente dUTP marcado con fluoróforos Cy5 o Cy3 (GE Healthcare), según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se purifica el producto con “QiaQuick® PCR purification kit” (Qiagen). La hibridación de DNA al microarray se realiza tal como han descrito anteriormente Eisen y cols; 1999.

2.8.3 Análisis de los datos de microarrays de DNA

Se escanearon los microarrays usando Scanner GenePix 4100A (Axon Instrument, Inc.) y se procesaron las imágenes con el software Genepix Pro 6.0 (Axon Instruments, Inc). Los datos fueron analizados según describe Britton y cols; 2002, usando el programa de análisis estadístico AlmaZen (Bioalma).

Para cada uno de los análisis realizados con microarrays se han utilizado tres réplicas y se incluyó un cambio de fluoróforo en una de ellas, para el análisis informático y estadístico.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.9 Citometría de flujo

Se centrifugan 200 μ l de cultivo de *B. subtilis* en MSgg y se resuspenden en 1ml de PBS pH 7,4. Se fijan las células en paraformaldehído 4% durante 2 h. Tras la fijación, las células son lavadas en PBS y resuspendidas en 20 μ l de tampón GTE (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 8), finalmente se guarda a 4° C durante 48 h hasta su análisis.

Para el análisis en citometría de flujo, se diluyen las células 1:100 en PBS y se incuban con 0,5 μ g μ l⁻¹ de DAPI durante 15 min y se mide la fluorescencia de 20.000 células mediante citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson) en el Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid). La fluorescencia se analizó mediante la excitación de láser a 360 nm acoplado a un filtro 424/44 nm. Las muestras se analizaron usando Cellquest y el estudio de solapamiento de intensidad de DAPI entre el tipo silvestre y el mutante se realizó mediante programa de análisis CXP. Los agregados celulares fueron discriminados basándonos en la altura *versus* el área de la intensidad de fluorescencia de las células. El experimento se repitió dos veces.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. **Caracterización de la producción de eDNA en la estirpe natural *B. subtilis* 3610**

La capacidad de secretar DNA al medio ha sido descrita en numerosos microorganismos (Catlin y cols; 1956; Crabb y cols; 1977; Hara y Ueda; 1981; Tani y Nasu; 2010). En la estirpe de laboratorio *B. subtilis* 168 se describió la presencia de bajas concentraciones de eDNA ($0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$) en sobrenadantes de cultivo, durante fase exponencial y estacionaria temprana (Lorenz y cols; 1991). Por otro lado, en nuestro laboratorio decidimos investigar la función del eDNA en la formación de biopelículas de la estirpe natural *B. subtilis* 3610, y para ello, valoramos la producción de DNA en esta bacteria. Observamos que la estirpe natural podía llegar a acumular hasta $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ en fase exponencial tardía y se decidió continuar con el estudio de este fenómeno para intentar resolver las cuestiones abiertas y no resueltas en el trabajo de Lorenz y cols; 1991.

Para cuantificar el eDNA se utilizó medio mínimo en condiciones aerobias, se extrajeron muestras de sobrenadante a lo largo del ciclo de crecimiento hasta fase estacionaria. Se precipitó el eDNA con etanol y se valoró su concentración mediante espectrofotometría. El sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* 3610 presenta baja concentración de eDNA al comienzo de la fase exponencial, pero al final de esa fase se observa un gran incremento, seguido de un rápido descenso (Fig. 11).

La concentración de eDNA en el punto máximo de producción es variable entre experimentos (entre 2 y $6 \mu\text{g ml}^{-1}$) y siempre se observa en la transición de fase exponencial a estacionaria, seguido de un drástico descenso. El eDNA se visualizó en gel de agarosa y aparece fragmentado en un rango entre 400 pb a 10 kpb (Fig. 11 B).

Por otro lado, se estudió la producción de eDNA de la estirpe de laboratorio *B. subtilis* PY79 y se comprobó que esta estirpe también produce eDNA con concentraciones máximas similares a *B. subtilis* 3610 ($4-8 \mu\text{g ml}^{-1}$) pero el patrón de producción no es reproducible y el máximo no se asocia a una fase de crecimiento concreta, por lo que se deduce que la producción no es específica como la de la cepa natural 3610 (Fig. 12). Por ello, nuestro estudio de la producción de eDNA en *B. subtilis* se ha realizado en la

RESULTADOS

estirpe natural, que presenta un patrón de producción de eDNA reproducible y que no ha sido modificada en el laboratorio por lo que mantiene las características de *B. subtilis* en la naturaleza.

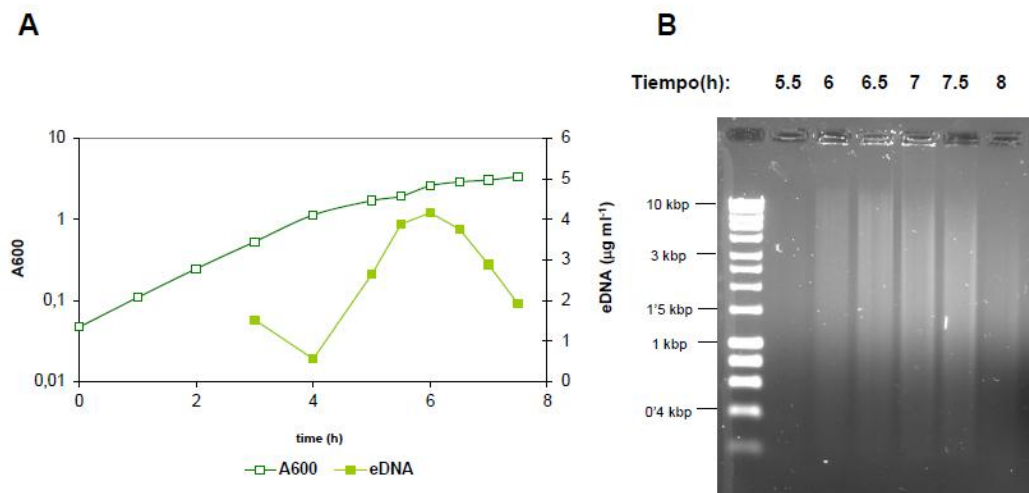


Figura 11. Producción de eDNA en *B. subtilis* 3610. A) Crecimiento de la estirpe 3610 en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez del cultivo a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo (µg ml⁻¹). Los datos mostrados se refieren a un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes. B) Visualización de eDNA en gel de agarosa 0,8%, las muestras de eDNA del gel mostrado provienen de una curva de crecimiento diferente a la mostrada en el apartado A).

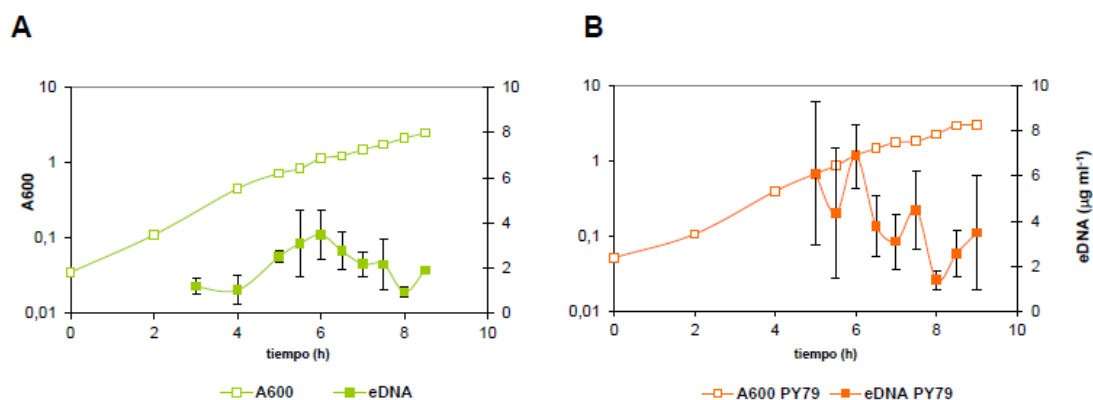


Figura 12. Variabilidad de la producción de eDNA durante el crecimiento de dos estirpes de *B. subtilis*: A) 3610 y B) PY79, en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento, se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA se refiere a la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo (µg ml⁻¹). Se muestran las barras de error de tres experimentos independientes para resaltar la variabilidad en la producción de eDNA en el cultivo de PY79 con respecto al de 3610.

RESULTADOS

1.1 Naturaleza del eDNA en *B. subtilis* 3610

1.1.1 Composición genética del eDNA

En otros microorganismos se ha *identificado* que el eDNA se corresponde con la totalidad del DNA cromosómico (Qin y cols; 2007; Steinberg y cols; 2005). Con el objetivo de determinar la composición genética del eDNA producido por *B. subtilis* 3610 se hibridaron sondas de eDNA y DNA cromosómico con microarrays de oligonucleótidos basados en la secuencia de *B. subtilis* 168.

Tal como se muestra en la Fig. 13, todos los genes hibridan por igual en el microarray, de lo que se concluye que el eDNA se corresponde con el genoma completo de *B. subtilis* y no hay ninguna región génica que esté mayormente representada.

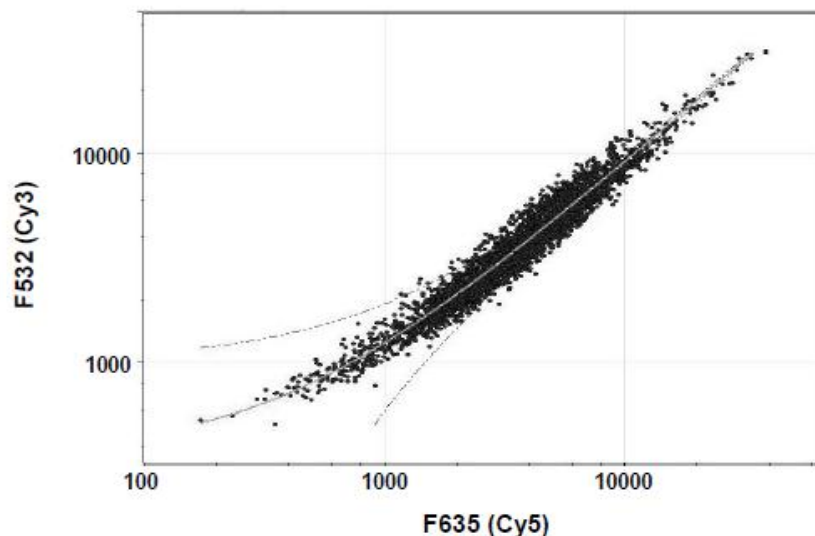


Figura 13. El eDNA producido por *B. subtilis* 3610 se corresponde con la totalidad su genoma. Se hibridan sondas de eDNA marcadas con CY3 (F532) y de DNA cromosómico con CY5 (F635) con microarray de oligonucleótidos basado en la secuencia de *B. subtilis* 168.

Por otro lado, para identificar si el material genético que se libera al medio extracelular se encuentra en forma de DNA de doble cadena o cadena simple o RNA, se incubaron muestras de eDNA con DNasa I (RNasa free), que específicamente degrada DNA de

RESULTADOS

cadena doble, y con nucleasa S1, que degrada únicamente DNA de cadena simple. Como se puede apreciar en la Fig. 14, sólo la DNasa I degrada completamente el eDNA por lo que se deduce que es DNA de cadena doble.

1.1.2 Variabilidad genética del eDNA

Una de las ventajas selectivas que puede tener la producción de eDNA en la población de *B. subtilis* es como fuente de variabilidad genética. Para verificar esta hipótesis se estudió el contenido de mutaciones en el eDNA, mediante el clonaje y la secuenciación de fragmentos de eDNA.

Se secuenciaron 22 clones, de los cuales 19 presentaban una secuencia idéntica a la de los mismos fragmentos de *B. subtilis* 168 presentes en las bases de datos. La secuencia de los otros 3 clones presentaban las siguientes divergencias con respecto a la secuencia de *B. subtilis* 168: 77% de similitud con la secuencia de *Clostridium perfringens* ATTC 13124, 95% de similitud con la proteína ribosomal L4 de *B. subtilis* 168 y 97% de similitud con el gen que codifica para RNAr 23S *B. anthracis*; esto se explica debido a la diferencia que existen entre las secuencias de *B. subtilis* 3610 y 168 (Srivatsan y cols; 2008). Por tanto de este resultado se concluye que una polimerasa con corrección de errores se encuentra implicada en la producción de eDNA y que la secuencia del eDNA se corresponde con la del DNA genómico.

1.1.3 Estudio de la presencia de DNasas en el medio de cultivo de la estirpe 3610

Durante la producción de eDNA en 3610 se ha observado en la mayoría de los ensayos que tras el máximo de concentración de DNA en el medio se produce un drástico descenso, en un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos. Con el objetivo de identificar la presencia de DNasas en el sobrenadante que puedan explicar este descenso, se incubaron los sobrenadantes extraídos a diferentes tiempos durante la producción de eDNA con un marcador de peso molecular

RESULTADOS

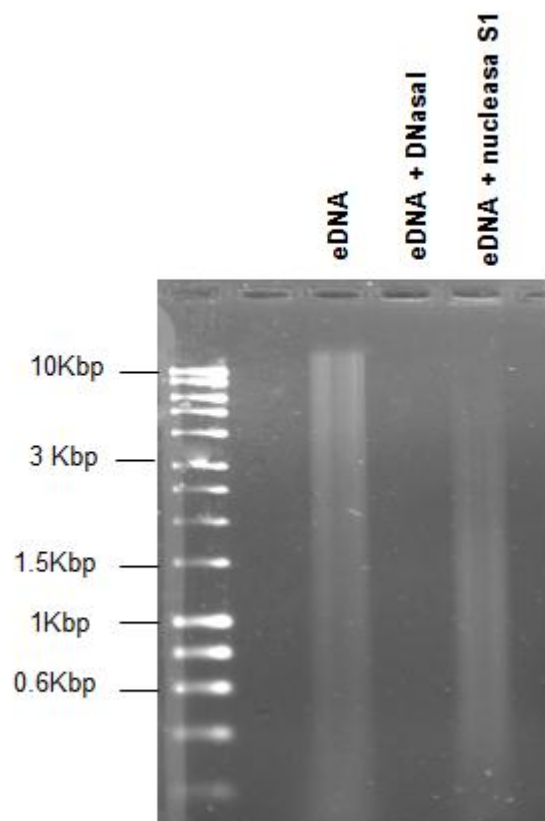
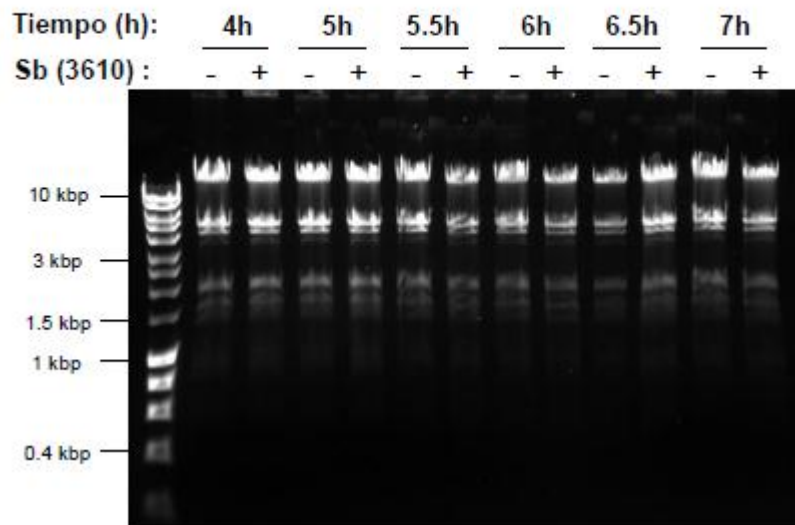


Figura 14. El eDNA producido por la estirpe 3610 es de doble cadena. El eDNA procede de un cultivo de 3610, se incubó separadamente con las enzimas DNasa I (RNasa free) y nucleasa S1. Solamente la enzima DNasa I degrada de forma completa el eDNA, por lo que se deduce que la composición mayoritaria del eDNA es DNA de cadena doble.

Como se puede observar en la Fig. 15 no existe degradación significativa del marcador de peso molecular al incubar con sobrenadante de 3610 ni al incubar con MSgg, con lo que se descarta que el descenso en la concentración de eDNA en el cultivo tras el máximo se deba a presencia de DNasas secretadas por 3610. No obstante, no se excluye que el descenso pueda ser debido a DNasas asociadas a la membrana de la bacteria.

RESULTADOS

A



B

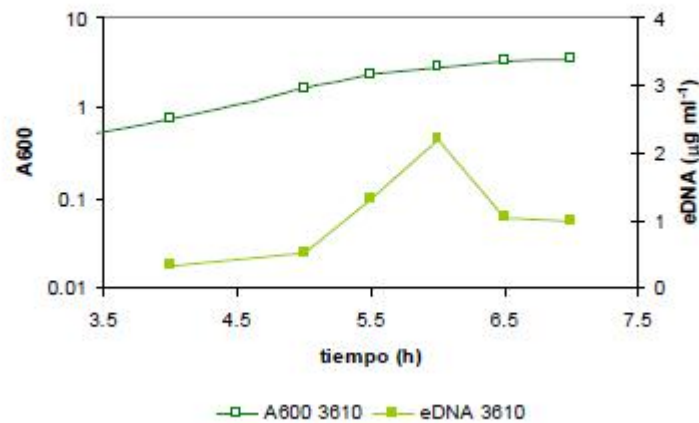


Figura 15. Estudio de la presencia de DNasas en el medio de cultivo de 3610. Gel de agarosa 0,8% con muestras de marcador de peso molecular incubadas con sobrenadante (Sb) de 3610 (se indican con "+") y con MSgg estéril (se indican con "-"). B) Cultivo de 3610 en MSgg a 37°C con agitación que se utilizó para la extracción de sobrenadante para el ensayo de DNasas (indica de donde se saca el sobrenadante). Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA se refiere a la concentración de eDNA en el sobrenadante del cultivo.

RESULTADOS

1.1.4 La producción de eDNA no está relacionada con mecanismos de lisis en *B. subtilis* 3610

Debido a la complejidad de las moléculas de DNA, su liberación al medio extracelular no puede ser por difusión simple, por lo que su salida de la célula debe estar mediada o bien por mecanismos de lisis o bien por medio de transporte activo.

Para determinar si existe lisis asociada a la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610 hemos realizado los siguientes ensayos:

1.1.4.1 Ensayo de actividad β -galactosidasa extracelular

En estudios de la producción de eDNA de otros microorganismos se han empleado ensayos de medida de actividad β -galactosidasa liberada en el sobrenadante, para determinar si la producción de eDNA estaba asociada a lisis celular (Allesen-Holm y cols; 2006; Steinmoen y cols; 2002). En nuestro caso, hemos usado la cepa 3610 *amyE::P_{f_{eu}}-lacZ* (EG385), que expresa la enzima β -galactosidasa de forma constitutiva, y se ha medido su actividad en el sobrenadante y en el interior de la célula en cultivos de esta estirpe en condiciones de la producción de eDNA.

Como se puede observar en la Fig. 16, la fracción de la actividad β -galactosidasa extracelular permanece constante, incluso durante el máximo de producción de eDNA y los valores son demasiado bajos para relacionarlos con una liberación de eDNA mediante mecanismos de lisis celular.

1.1.4.2 Estudio de la viabilidad bacteriana durante la producción de eDNA

Por otro lado, se realizaron otros experimentos complementarios al ensayo de la actividad β -galactosidasa, como son el estudio de la viabilidad durante la producción de eDNA mediante diluciones seriadas y recuento de UFC y por tinción fluorescente diferencial de células vivas y muertas (Live/Dead BacLight kit). Como se aprecia en la Fig. 17, la viabilidad permanece constante durante la producción de eDNA, y el porcentaje de células muertas en el cultivo se mantuvo por debajo del 5% incluso durante el máximo de producción. Estos resultados confirman los obtenidos mediante

RESULTADOS

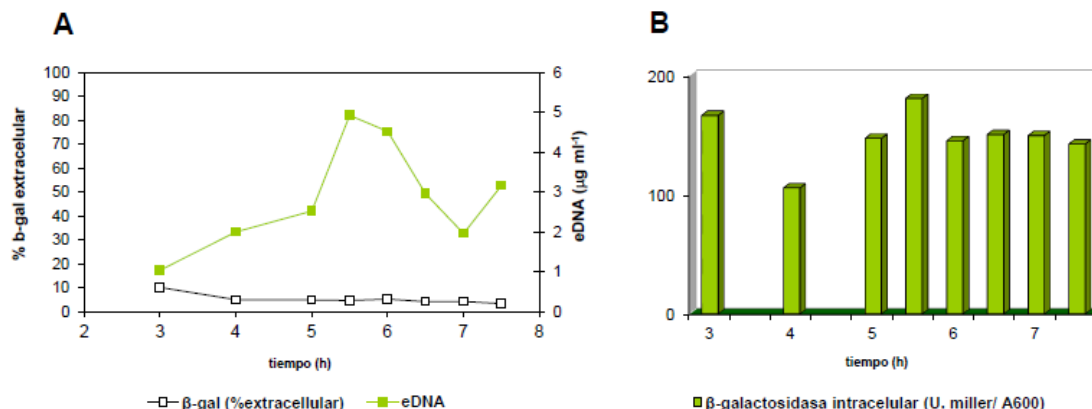


Figura 16. La producción de eDNA en *B. subtilis* 3610 no está relacionada con lisis celular. A) Medición de actividad β -galactosidasa durante el crecimiento de la estirpe 3610 *amyE::Pfeu-lacZ* (EG385) en MSgg. % b-gal extracelular se refiere al porcentaje de actividad β -galactosidasa presente en la fracción extracelular respecto a la intracelular, eDNA se refiere a la concentración de eDNA producido por esta estirpe. No se muestran datos de crecimiento bacteriano para simplificar el gráfico. B) Medición de la actividad β -galactosidasa intracelular (Unidades Miller) durante el crecimiento bacteriano de la estirpe EG385.

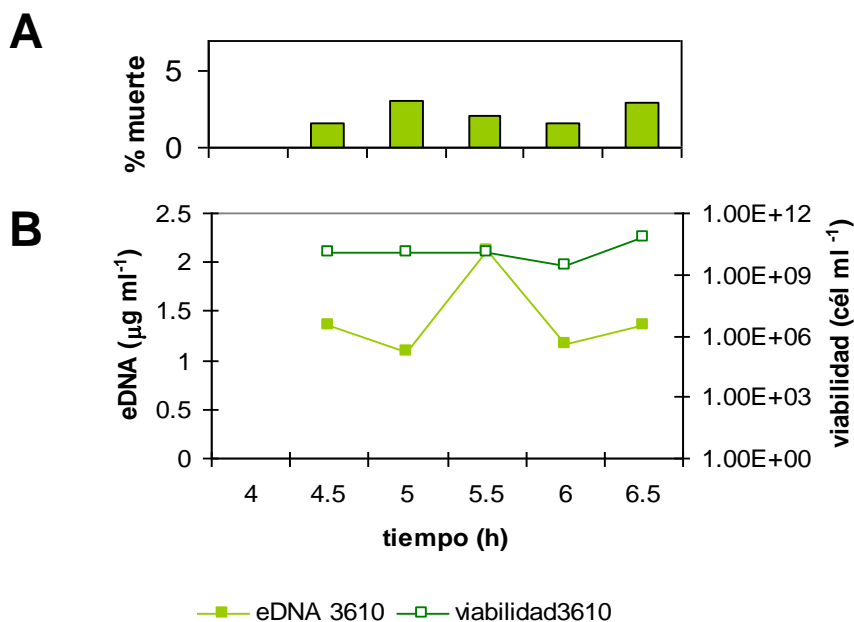


Figura 17. Ensayos de viabilidad durante el crecimiento de *B. subtilis* 3610 durante la producción de eDNA. A) Porcentaje de células muertas en un cultivo de 3610, cuantificado por la tinción fluorescente Live/Dead y microscopía de fluorescencia. B) Viabilidad bacteriana en un cultivo de 3610. El eDNA se refiere a la concentración del eDNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$), la viabilidad 3610 representa la viabilidad bacteriana (nº de células/ml de cultivo). No se muestran los datos de crecimiento bacteriano para simplificar el gráfico.

RESULTADOS

el ensayo de actividad β -galactosidasa, indicando que no existen procesos de lisis significativos en el cultivo de *B. subtilis* 3610 durante la secreción de eDNA.

1.1.4.3 Estudio del efecto sobre la producción de eDNA de mutaciones en genes implicados en procesos líticos en *B. subtilis*

Para descartar completamente la lisis como mecanismo de producción de eDNA en 3610 decidimos comprobar el efecto sobre la misma de genes relacionados con procesos líticos en *B. subtilis*. Para ello, introducimos en la estirpe 3610 mutaciones en los genes que codifican para las autolisinas *lytABC* y *lytE* (Margot 1999) y en los genes implicados en canibalismo, *skf* y *sdp*, los cuales codifican para antibióticos involucrados en la muerte de las células que no esporulan durante el proceso conocido como canibalismo (González-Pastor y cols; 2003; González Pastor; 2011).

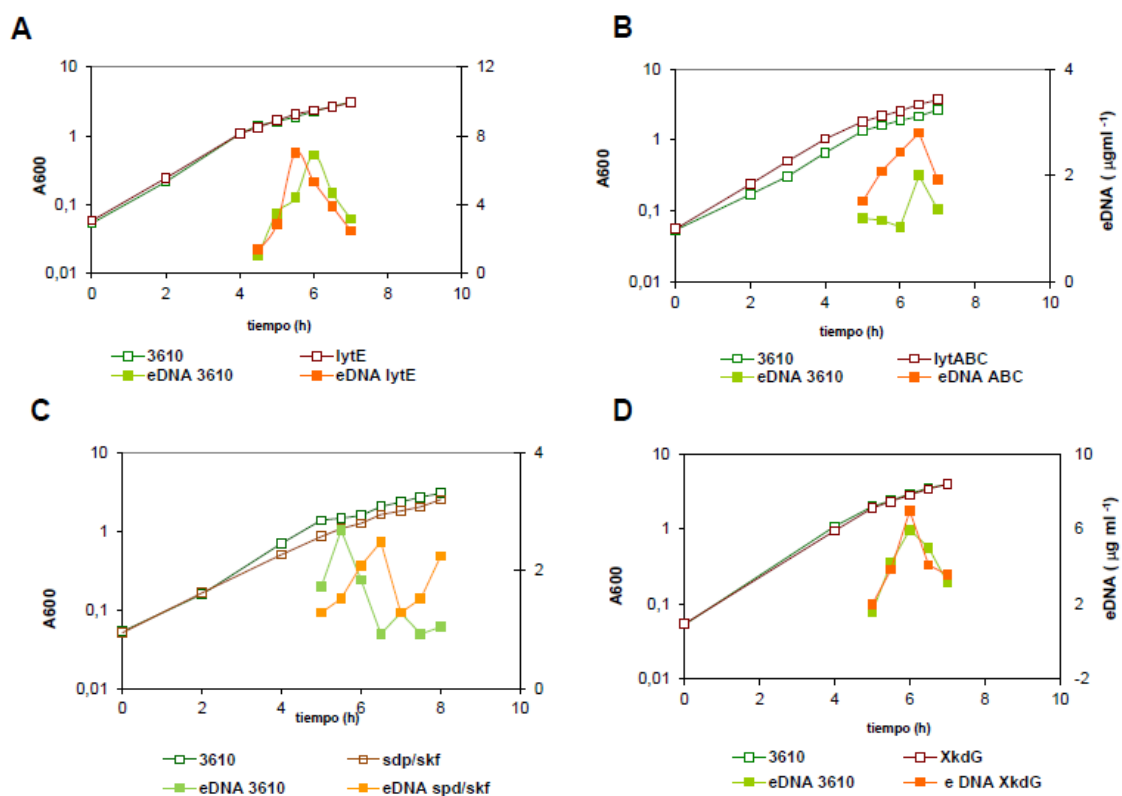


Figura 18. Diversos procesos líticos en *B. subtilis* no afectan a la producción de eDNA en 3610. Efecto de las mutaciones de genes que intervienen en fenómenos de lisis en *B. subtilis* en la producción de eDNA. A) y B) Mutantes en genes que codifican para autolisinas *LytE* y *LytA* *LytB* y *LytC*. C) Mutantes afectados en genes de canibalismo *sdp/skf* D) mutante en *xkdG*, afectado en una proteína de la cápside de PBSX. Cultivos en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

RESULTADOS

Por otro lado, el trabajo realizado por Shingaki y cols; 2003 pone de manifiesto la relación entre la presencia de eDNA fragmentado en cultivos de *B. subtilis* 168 (dos bandas, una de 13 kb y 50 kb) durante la fase exponencial y su relación con genes que codifican proteínas de la cápside del profago PBSX. Por lo que decidimos construir un mutante 3610 *xkdG*, gen que codifica para la capsida de PBSX en 3610, y que afecta a la producción de esos fragmentos de eDNA.

Como se muestra en la figura 18 ninguno de los mutantes que comprobamos en 3610 dejan de producir eDNA al medio, si bien se puede observar que el mutante 3610 *lytABC* parece producir mayor cantidad de eDNA, y el mutante 3610 *sdp/skf* tiene el máximo de producción de eDNA levemente desplazado en el tiempo con respecto al silvestre (obsérvese que en ambos casos, el crecimiento del mutante está ligeramente afectado en relación con el silvestre).

Por lo tanto, concluimos que los procesos líticos inducidos por las autolisinas y por los genes del fenómeno de canibalismo no intervienen en la producción de eDNA en *B. subtilis*. Así como la liberación de fragmentos de eDNA asociados al profago PBSX (Shingaki y cols; 2003) en *B. subtilis* 168 no está relacionada con la producción de eDNA en la estirpe 3610.

2. Estudio de genes implicados en la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610

Un problema recurrente en el estudio de los genes implicados en producción de eDNA en microorganismos es el desarrollo de una estrategia efectiva de búsqueda de genes.

Las colonias formadas por 3610 en medio sólido rico presentan una morfología compacta, no se extienden apropiadamente en el medio (Fig. 19). Hemos observado que alrededor del 5% de las colonias que crecen en LB desarrollan unas ramificaciones desde el borde de la colonia que se pueden extender con más facilidad por el medio. Al realizar un aislamiento de estas ramificaciones, se observó que forman colonias con una morfología diferente a la formada por 3610, y que se pueden propagar mejor por la superficie, se denominó morfología extendida (spread, SPR). Este fenotipo es heredable en un gran número de casos (Fig. 19).

RESULTADOS

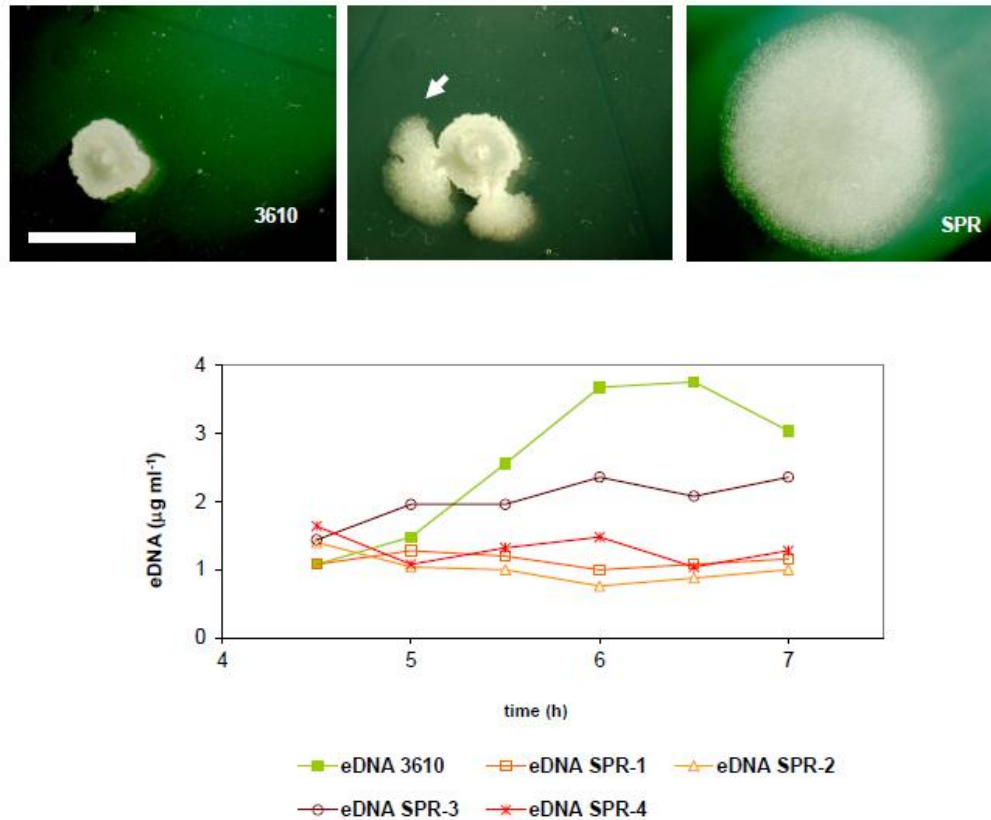


Figura 19. Fenotipo del mutante espontáneo SPR. En la parte superior se observa las diferencias de morfología entre 3610 y el mutante espontáneo SPR (GP305). La fotografía de la izquierda muestra colonia de 3610 con morfología compacta; la fotografía del medio, muestra una colonia de 3610 con dos ramificaciones; la fotografía de la izquierda muestra una colonia del mutante SPR (GP305) aislado de una ramificación. La barra representa 1 cm. En la parte inferior se representa la producción de eDNA de 3610 y los diferentes mutantes isogénicos SPR aislados: SPR-1 (GP305), SPR-2 (GP306), SPR-3 (GP307) and SPR-4 (GP319). No se muestra el crecimiento bacteriano para simplificar el gráfico; eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Nos preguntamos si las diferencias morfológicas que se observan entre 3610 y los mutantes extendidos podían estar relacionados con la producción de eDNA. Para ello, estudiamos la producción de eDNA en cuatro mutantes espontáneos independientes, y observamos que presentaban una disminución significativa de la producción de eDNA y todos carecían del máximo de producción característico de 3610 (Fig. 19). Estos resultados apoyan la hipótesis de una relación entre la morfología extendida y el fenotipo “no productor de eDNA”. Esta relación fue la base para realizar un rastreo

RESULTADOS

visual para identificar genes implicados en la producción de eDNA basándonos en el fenotipo extendido.

Se construyó una biblioteca de mutantes por inserción de transposones en la estirpe DS1010 derivada de *B. subtilis* 3610, que porta en su genoma el transposón mini-Tn10. De los clones obtenidos, sólo el 3% no presentaban la inserción del transposón mini-Tn10. Se hizo un rastreo visual de 18.900 colonias con inserciones de transposón y 34 de ellas presentaban morfología extendida. Se probó su capacidad de producir eDNA y se identificó que el 88% eran deficientes en la producción de eDNA (datos no mostrados). Se identificó por secuencia la localización de las inserciones según se describe en materiales y métodos, y las mutaciones de las colonias seleccionadas se retransformaron en *B. subtilis* 3610 para confirmar que el defecto de producción de eDNA estaba ligado a la inserción del transposón y no a una mutación secundaria. Finalmente, se seleccionaron 23 mutantes que presentan morfología extendida y una reducción significativa en la producción de eDNA (Tabla 5).

Doce inserciones se localizan en la misma posición dentro del gen *oppA*, una dentro de *oppF*, cuatro en la región *comXP* y una en el gen *degU*, todos estos genes están implicados en competencia y *quorum sensing*. Además, se ha identificado dos inserciones en diferentes posiciones del gen *mfd* y una dentro de *topA*, ambos genes están relacionados con reparación y replicación del DNA. Finalmente, se ha identificado en dos clones una inserción en la misma posición dentro del gen *yqhG*, que codifica una proteína de función desconocida.

En resumen, la mayoría de inserciones que presentan una morfología extendida en 3610, afectan negativamente a la producción de eDNA, y se encuentran en genes relacionados con competencia, *quorum sensing*, reparación y replicación de DNA.

RESULTADOS

Nº DE CLONES	GEN	INSERCIÓN	FUNCIÓN
12	<i>oppA</i>	CGCTTGACC	Permeasa de oligopéptidos, involucrada en <i>quorum sensing</i> , esporulación y competencia
1	<i>oppF</i>	GCTCACATA	Permeasa de oligopéptidos, involucrada en <i>quorum sensing</i> , esporulación y competencia
1	<i>ΔcomX-comP</i>	AAAGCTTAT TGCTGAGC	ComX, feromona involucrada en competencia
3	<i>comP</i>	AACTTTGAC GGTGTAAC GGTCAAGCA	ComP, quinasa que activa a ComA mediante fosforilación. Competencia
1	<i>degU</i>	GTTGTGGTC	Factor de transcripción. Regulador de la competencia
2	<i>mfD</i>	GACCCTTAC TGCAGGCTA	Reparación de DNA y recombinación homóloga
1	<i>topA</i>	TGTGAAGTG	DNA topoisomerasa I
2	<i>yqhG</i>	GGCCCCGCG	Desconocida

Tabla 5. Genes implicados en producción de eDNA identificados en la biblioteca de transposición. Los genes resaltados en rojo están involucrados en competencia. Los genes resaltados en azul, están involucrados en metabolismo de DNA. El gen desconocido *yqhG* se resalta en verde.

2.1 Análisis del perfil transcripcional de mutantes implicados en la producción de eDNA mediante microarrays

Con el objetivo de comprender la relación que existe entre las mutaciones identificadas más relevantes y la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610, se ha realizado un análisis de la expresión génica de los mutantes mediante la técnica de microarrays. Para ello, se utilizaron microarrays de oligonucleótidos basados en la secuencia de *B. subtilis* 168 (Britton y cols; 2002), y se comparó el perfil transcripcional

RESULTADOS

de la estirpe 3610 (tipo silvestre) con el de tres mutantes isogénicos afectados en la producción de eDNA: 3610-SPR 1 (mutante espontáneo de morfología extendida, desconocemos qué gen o genes están afectados), y dos de los mutantes identificados en la librería de transposición, el mutante *degU::mini-Tn10* (GP229), regulador clave de la ruta de competencia tardía, esporulación y motilidad (Kobayashi; 2007) y el mutante *oppA::mini-Tn10* mutant (GP233), esta mutación ha sido identificada en 12 de los 23 clones aislados en la librería de transposición, y su función está relacionada con *quorum sensing* y competencia (Rudner y Ledeaux; 1991; LeDeaux y cols; 1997).

Para identificar aquellos genes cuya expresión se ve afectada, inducida o inhibida en estos mutantes, se aisló su RNA y el de la estirpe control 30 minutos antes del máximo de producción de eDNA, momento en el que ya existe una diferencia significativa en la cantidad de eDNA en el medio. Se hicieron al menos tres réplicas de cada experimento. Después del análisis estadístico de los resultados, seleccionamos aquellos genes en los que observamos una diferencia de expresión de 2,5 o mayor (Fold Change > 2.5) y con un P value menor o igual a 0,2 (Fig. 20).

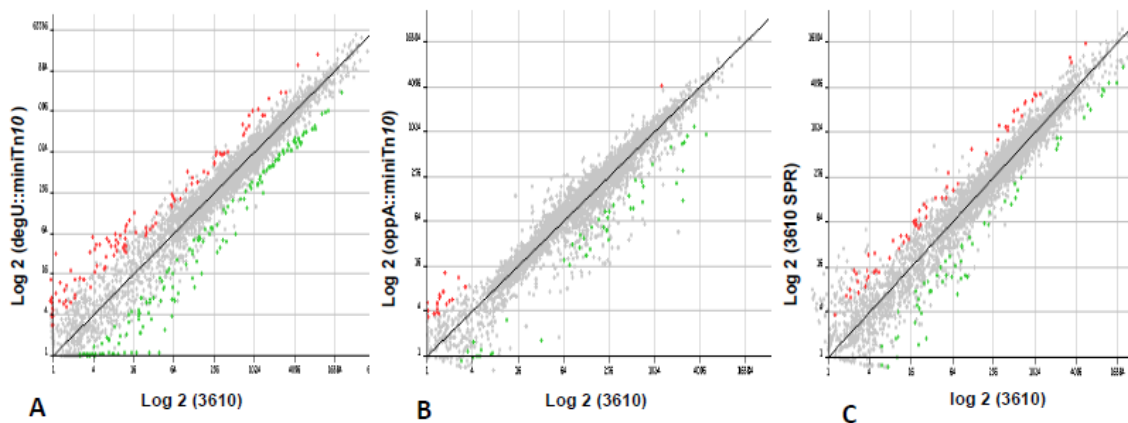


Figura 20. Perfil de transcripción de los genes de 3610 comparado con el de los genes de los mutantes *degU::mini-Tn10* (A), *oppA::mini-Tn10* (B) y 3610 SPR (C). Gráficos de la intensidad de fluorescencia de hibridación con los genes del microarray (unidades arbitrarias). Los genes que aparecen en color son los que cumplen los requisitos de F.Change $\geq 2,5$ y P. value $\leq 0,2$, Los genes que se inhiben en el mutante se representan con color verde y los genes que se inducen con el color rojo. Las listas de los genes diferencialmente expresados se encuentran en las tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en la sección de anexos.

RESULTADOS

Hemos identificado 48 genes con una expresión génica diferencial entre 3610 y el mutante extendido (GP305) durante la producción de eDNA (aproximadamente el 1,2% del genoma de *B. subtilis* 3610). En el mutante SPR se reprimen 23 genes, cuyas funciones se relacionan con procesos de metabolismo (14%), traducción de proteínas (5%), esporulación (14%), proteínas ribosomales (44%), y genes de función desconocida (23%). Por otra parte, hemos identificado 25 genes que se inducen en el mutante de forma significativa: producción de antibióticos (13%), metabolismo de aminoácidos (4%), el operón que codifica para el transportador de dipéptidos Dpp (29%), procesos de traducción (4%), modificación y reparación del DNA (8%), inhibición de la esporulación (8%) y genes con función desconocida (34%) (Fig. 21).

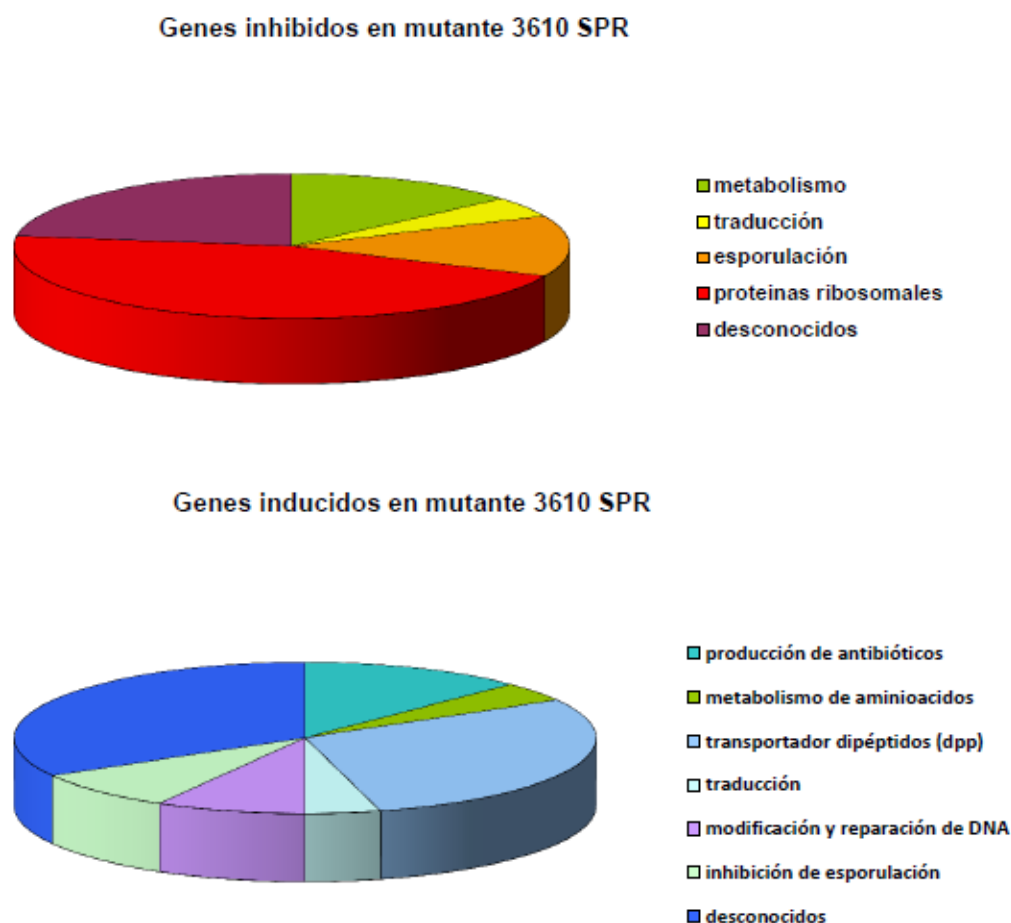


Figura 21. Resumen de los genes que se inhiben y se inducen en el mutante SPR de forma significativa. En las tablas 6 y 7 del anexo aparecen detallados los genes cuya expresión es significativamente diferente en 3610 y en 3610 SPR.

RESULTADOS

A continuación, se analizaron las diferencias en la expresión génica entre 3610 y 3610 *degU::mini-Tn10*. Se identificaron 108 genes, de los cuales en el mutante 72 genes se reprimen (el 64% implicados en motilidad y quimiotaxis, el 4% pertenecen al operón *yukEDCBayueBCD* y el 32% de función desconocida) y 36 genes se inducen (16% implicados en producción de antibióticos, el 11 % en metabolismo, el 16% en esporulación, otro 11% pertenecen al operón *dpp*, un 3% en modificación y reparación del DNA, un 3% en secreción de proteínas, un 3% en la síntesis de surfactina y finalmente el 37% tienen una función desconocida) (Fig. 22).

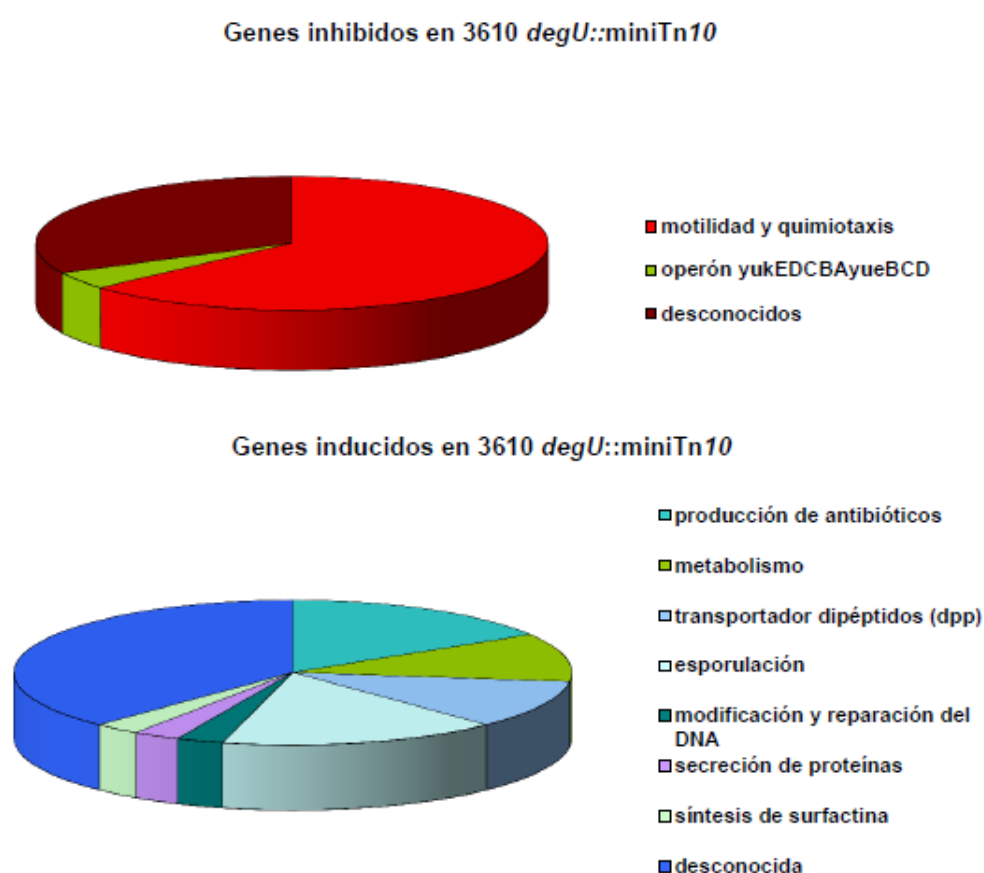


Figura 22. Resumen de los genes que se inhiben y se inducen en el mutante 3610 *degU::mini-Tn10* de forma significativa. En las tablas 8 y 9 del anexo aparecen detallados todos los genes cuya expresión es significativamente diferente en 3610 y en 3610 *degU::mini-Tn10*.

RESULTADOS

Finalmente, se comparó el perfil transcripcional de las estirpes 3610 y 3610 *oppA::mini Tn10*. Un total de 25 genes se expresan diferencialmente, de los cuales en el mutante se inhiben 24 genes y solamente uno se induce.

Los genes que se inhiben en el mutante *oppA* durante la producción de eDNA están involucrados en metabolismo de aminoácidos y nitrógeno (22%), metabolismo (26%), genes del transportador Opp (22%) y un 30 % tienen función desconocida (Fig. 23). En el mutante *oppA* aparece significativamente inducido el gen *ilvB* que interviene en el metabolismo de aminoácidos.

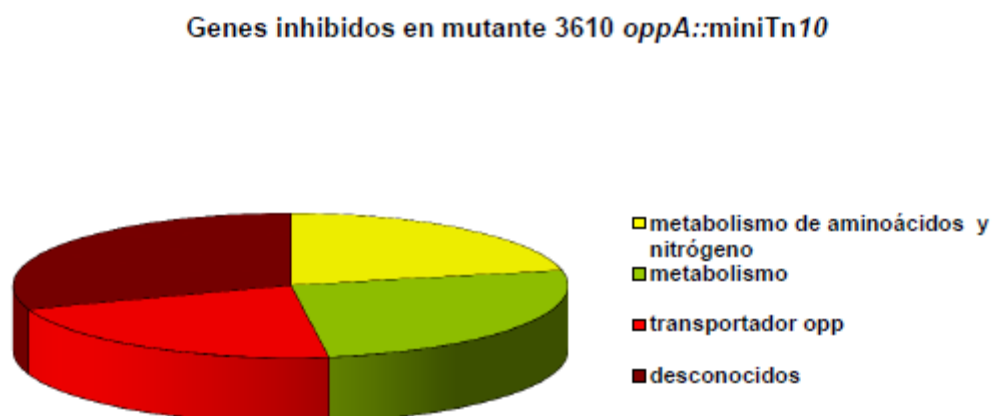


Figura 23. . Resumen de los genes que se inhiben en el mutante 3610 *oppA::mini-Tn10* de forma significativa. No se representa gráfico de los genes inducidos en el mutante, ya que sólo se induce el gen *ilvB* de forma significativa. En las tablas 10 y 11 del anexo se detallan estos genes.

El análisis comparativo de los perfiles de transcripción nos indica que el mutante 3610-SPR presenta un patrón de expresión génica similar al de la mutación *degU::mini-Tn10* genes, observándose que el 40% de los genes inducidos por la mutación SPR también se inducen en el mutante *degU::mini-Tn10* (Fig. 24). Esto no ocurre con los genes que se inhiben.

RESULTADOS

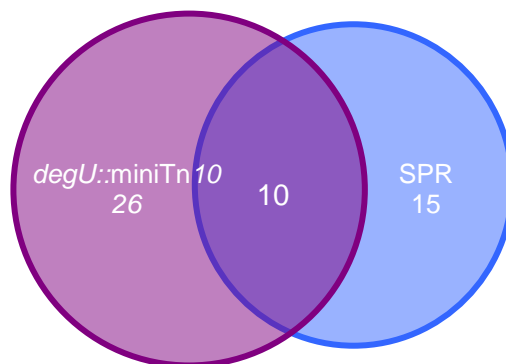


Figura 24. Diagrama de Venn que ilustra los genes que se inducen en el mutante *degU::mini-Tn10* y en el mutante SPR y los que comparten.

3. La producción de eDNA está regulada por genes de la ruta de competencia

El 78% de los genes identificados en la biblioteca de transposición son genes esenciales en la ruta de competencia temprana, lo que apunta a la existencia de una relación entre esta ruta y la producción de eDNA. Por ello decidimos profundizar en el estudio del efecto de diversos genes que intervienen en la ruta de competencia en la producción de eDNA.

Doce de los clones aislados defectivos en producción de eDNA tienen una inserción en el gen *oppA* (un 52% de los clones aislados) y además otro de los clones tiene una inserción en el gen *oppF* que pertenece al mismo operón *opp*, de lo que se deduce que este operón debe tener un papel relevante en la producción de eDNA. Este operón interviene en procesos de competencia mediante la importación de diferentes péptidos solubles tales como CSF (Factor de competencia y esporulación), codificado por el gen *phrC*, (Salomón y cols; 1996), *PhrF*, *PhrK*, *PhrG* y *PhrH* (Auchtung y cols; 2006). Por ello, decidimos estudiar si las mutaciones en los genes *phrC*, *phrF*, *phrK* y *phrG* afectaban a la producción de eDNA. Observamos que al introducir la mutación de los genes *phrC*, *phrF* y *phrK* en la estirpe 3610 la morfología de colonia era idéntica a la de la cepa silvestre, pero la mutación en el gen *phrG* producía un fenotipo de morfología extendida. La producción de eDNA de los mutantes *phrC*, *phrF* y *phrK* es

RESULTADOS

menor (pérdida entorno al 50-60%), y concretamente *phrC* es el gen que menos afecta al fenotipo, ya que continúa manteniendo el pico de producción de eDNA, aunque disminuido, en cambio una mutación en *phrG* produce un descenso drástico de la concentración de eDNA de un 60%-70%, perdiéndose el pico de máxima producción (Fig. 25).

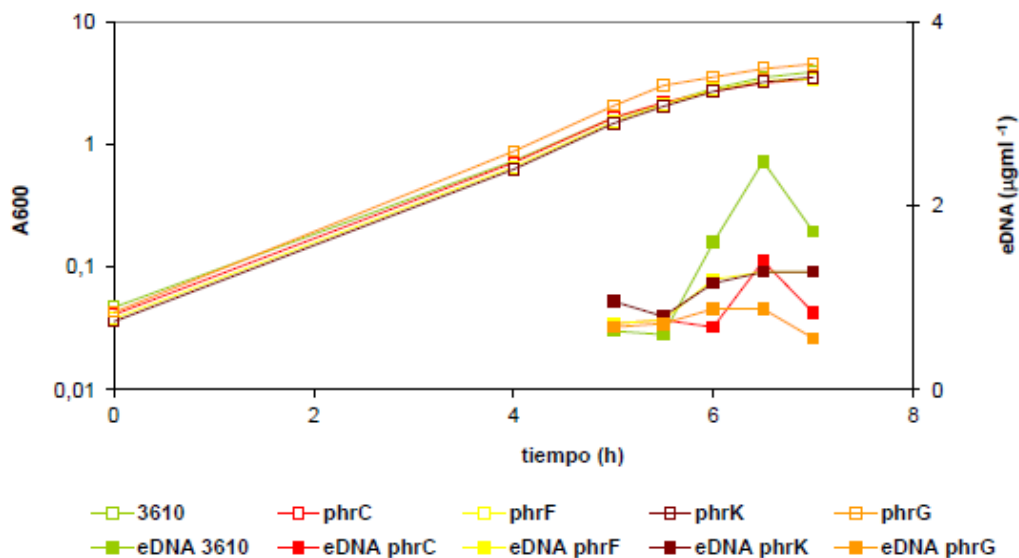


Figura 25. Efecto de las mutaciones en *phrC*, *phrF*, *phrK* y *phrG* en la producción de eDNA en 3610. Comparación de la producción de eDNA entre 3610, 3610 *phrC::tet*, 3610 *phrF::mls*, 3610 *phrK::spc* y 3610 *ΔphrG::cat*. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Además de los genes que codifican para las subunidades de la permeasa Opp, se identificaron inserciones del transposón en los genes *comP* y *comX*, que también intervienen en la regulación de la competencia temprana. La feromona ComX estimula la actividad de la kinasa ComP (Salomón y cols; 1995), que finalmente activa al factor de transcripción ComA, un regulador que inicia el desarrollo de la competencia (Weinrauch y cols; 1990). Por otra parte, se cuantificó la producción de eDNA de los mutantes *comA* (GP240) y *srfAA* (EG245) cuya transcripción se induce por ComA (Cosby y cols; 1998); (Hamze y cols; 2009) y se observó que ambos mutantes están

RESULTADOS

afectados en la producción de eDNA, lo que confirma la relación de este fenómeno con la competencia. Además, hemos identificado que el regulador principal de la esporulación, Spo0A, que controla además la ruta de competencia (Spizizen; 1965) (Roggiani y cols; 1990), es también defectivo en la producción de eDNA (Fig. 26).

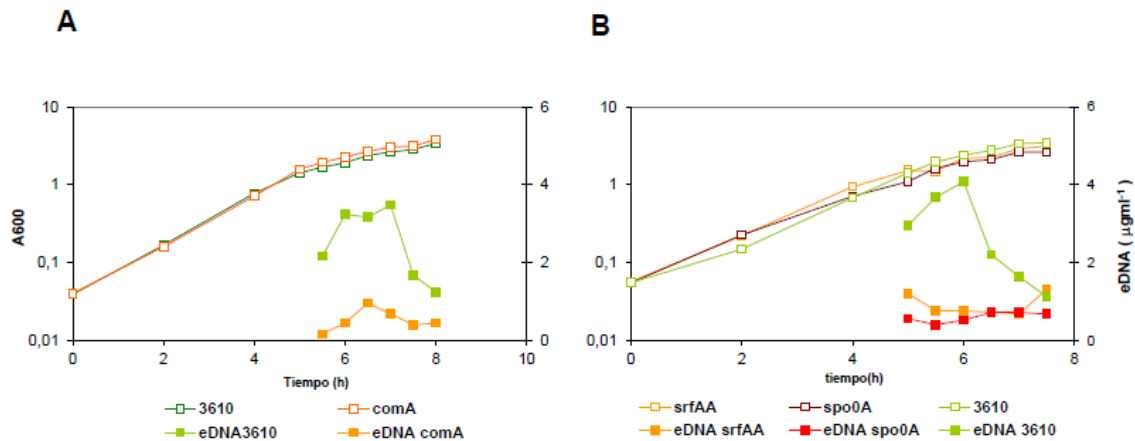


Figura 26. Mutantes afectados en competencia temprana *comA*, *srfAA* y *spo0A* son defectivos en la producción de eDNA. A) Comparación de la producción de eDNA entre 3610 y 3610 $\Delta comA$ B) Comparación de la producción de eDNA entre 3610, 3610 $\Delta srfAA$ y 3610 $\Delta spo0A$. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Dentro del operón implicado en la producción de surfactina, *srfA*, en el segundo gen, *srfAB* se encuentra el gen *comS* con un marco de lectura distinta, y su transcripción se puede ver afectada de forma polar por una mutación en el primer gen, *srfAA* (D'Souza y cols; 1994). Para determinar si el efecto de la mutación del gen *srfAA* realmente estaba afectando directamente a la producción de eDNA o si era un efecto polar del gen *comS*, probamos la producción de surfactina de los mutantes 3610 *phrC*, 3610 *degU::mini-Tn10*, 3610 *oppA::mini-Tn10* y 3610 SPR en medio sólido DSM, que permite observar un halo producido por la surfactina, próximo a la colonia. Como control negativo usamos el mutante 3610 *srfAA* y 3610 *comA*. Observamos que las mutaciones *phrC*, *degU*, *oppA* y SPR permiten la producción de surfactina, por lo que la surfactina no está directamente relacionada con la secreción de eDNA en *B. subtilis* (Fig. 27).

RESULTADOS

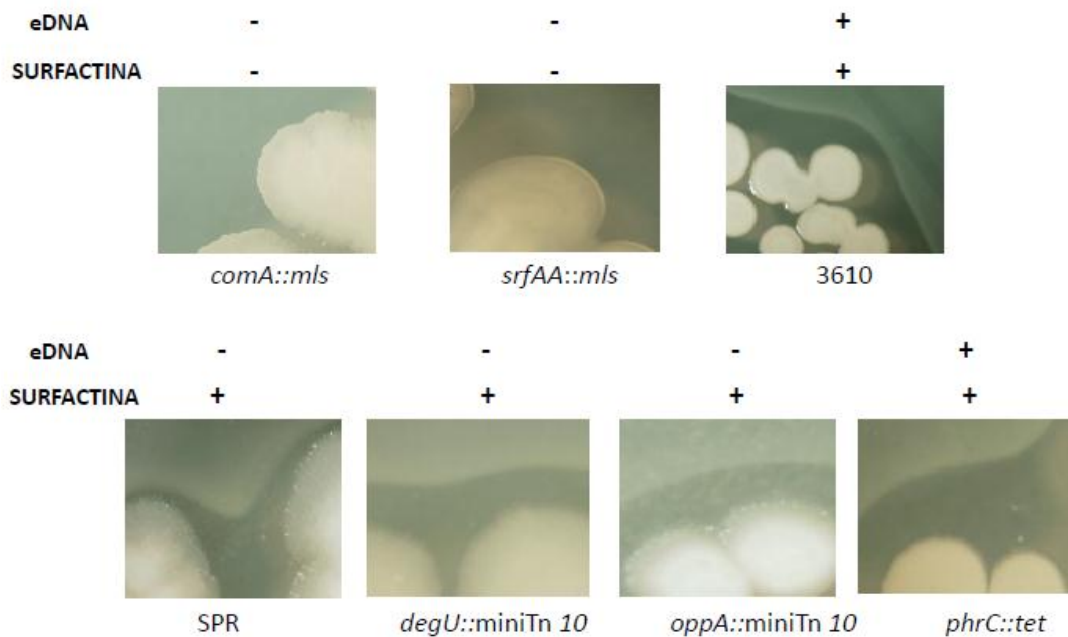


Figura 27. La síntesis de surfactina no está relacionada con la producción de eDNA. En la parte superior se muestran los controles, control positivo de producción de surfactina es la estirpe silvestre y los controles negativos son los mutantes 3610 *comA* y 3610 *srfAA*. En la parte inferior, se muestra la producción de surfactina en diferentes mutantes productores de eDNA (+): 3610 *phrC* y mutantes no productores de eDNA (-) como 3610 SPR, 3610 *degU::mini-Tn10* y 3610 *oppA::mini-Tn10*. La producción de surfactina se realizó en placas de DSM y se visualizaron tras el crecimiento durante 24 h a 37° C. La surfactina se visualiza como un halo alrededor de la colonia.

Finalmente, se comprobó si los genes involucrados en competencia tardía, los genes que codifican para el sistema de importación de DNA durante la competencia, están relacionados con el transporte de eDNA al medio. Para ello, estudiamos el efecto en la producción de eDNA en genes afectados en competencia tardía, tales como *comK* (GP237), el principal regulador de la competencia tardía (Hahn y cols; 1994); (van Sinderen y Venema; 1994) y otros genes que codifican para el transportador de DNA durante la competencia, como *comEA* (GP241) (Inamine y Dubnau; 1995) y *comGA* (GP239) (Cheng y Dubnau; 1998). Todos estos mutantes producen eDNA de forma similar a la estirpe silvestre, por lo tanto se excluye su participación en este fenómeno (Fig. 28).

Los resultados obtenidos indican que la producción de eDNA está regulada por genes de competencia temprana, siendo fundamental para la producción de eDNA la señal

RESULTADOS

que desencadenan los péptidos involucrados en señalización de *quorum sensing*. Por otro lado, los reguladores de la competencia tardía y la maquinaria de importación del DNA durante la competencia no intervienen en el proceso de producción de eDNA.

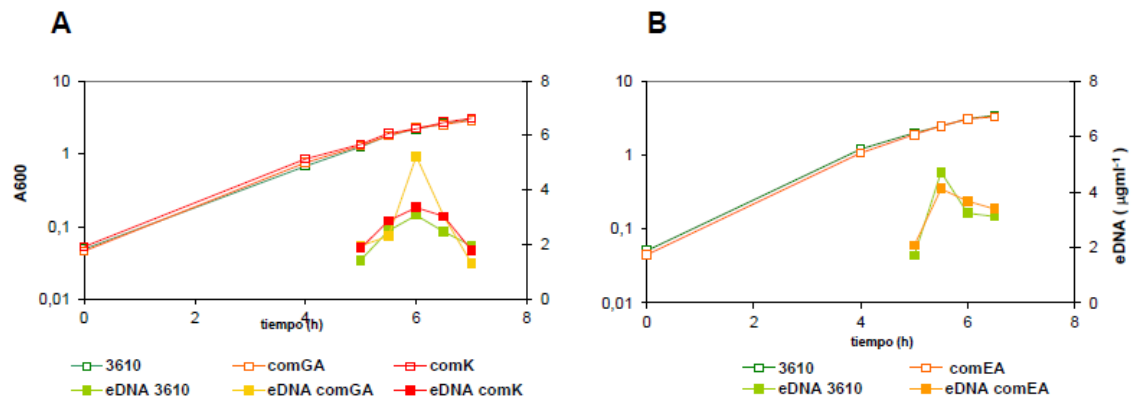


Figura 28. Mutaciones en los genes de competencia tardía *comGA*, *comK* y *comEA* no afectan a la producción de eDNA. A) Comparación de la producción de eDNA entre 3610, 3610 $\Delta comGA$ y 3610 $\Delta comK$ B) Comparación de la producción de eDNA entre 3610 y 3610 $\Delta comEA$. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

4. Genes de motilidad implicados en producción de eDNA

Los datos obtenidos mediante microarrays indican que el mutante *degU::miniTn10* produce una inhibición significativa de genes implicados en motilidad durante la producción de eDNA, así que decidimos analizar el efecto de genes de motilidad en la producción de eDNA. Por ello analizamos los mutantes 3610 σ^D y 3610 *hag*. El gen σ^D codifica para el factor sigma que induce la expresión de genes de motilidad (Arnosti y cols; 1989) y *hag* codifica para la flagelina, la proteína estructural del flagelo (Barilla y cols; 1994). Los dos mutantes tienen un defecto en la producción de eDNA (Fig. 29).

RESULTADOS

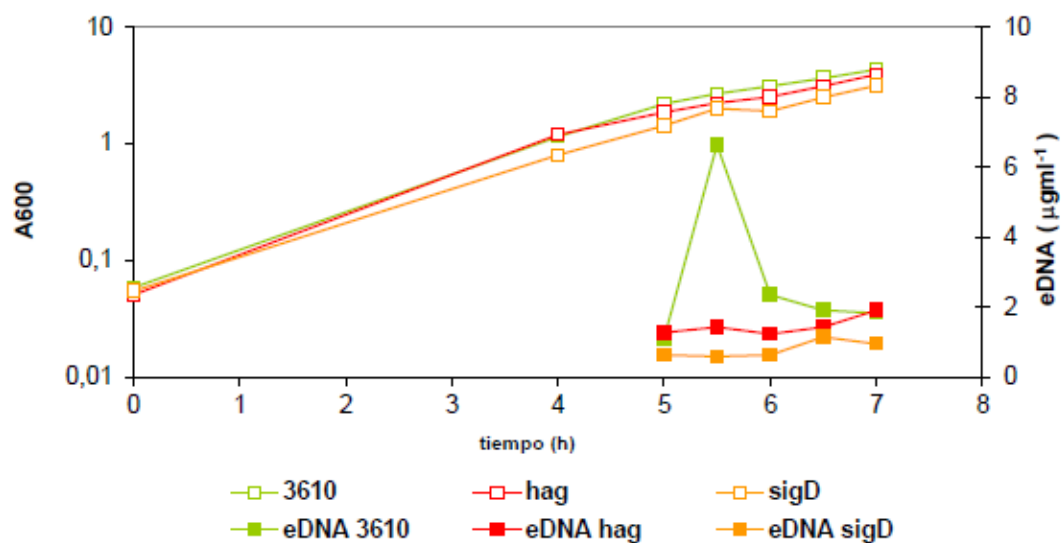


Figura 29. Mutantes afectados en motilidad no producen eDNA. Comparación de la producción de eDNA entre 3610, 3610 *sigD::cat* (σ^D) y 3610 *hag::mIs*. Los cultivos se realizaron en MSgg a 37°C con agitación. Para la curva de crecimiento se midió la turbidez de los cultivos a una absorbancia de 600nm (A600), eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

5. Una subpoblación de células con mayor contenido en DNA podría estar implicada en la producción de eDNA.

Hemos descrito que la estirpe de *B. subtilis* 3610 libera al medio 4-6 $\mu\text{g/ml}$ de DNA y no se debe a un mecanismo de lisis, lo que implicaría un aumento en la replicación de DNA compatible con la duplicación del cromosoma y la secreción de eDNA. De hecho, hemos identificado el gen *topA*, involucrado en replicación, de DNA en la búsqueda de mutantes afectados en producción de eDNA. Para comprobar esta hipótesis empleamos una tinción fluorescente, DAPI, para marcar el DNA de células silvestres y de mutantes defectivos en eDNA durante el momento de máxima producción. Mediante microscopía de fluorescencia se observó una mayor intensidad de fluorescencia en las células productoras de eDNA en comparación con las células mutantes *degU::mini-Tn10* (GP229) y *oppA::mini-Tn10* (GP233) (Fig. 30).

RESULTADOS

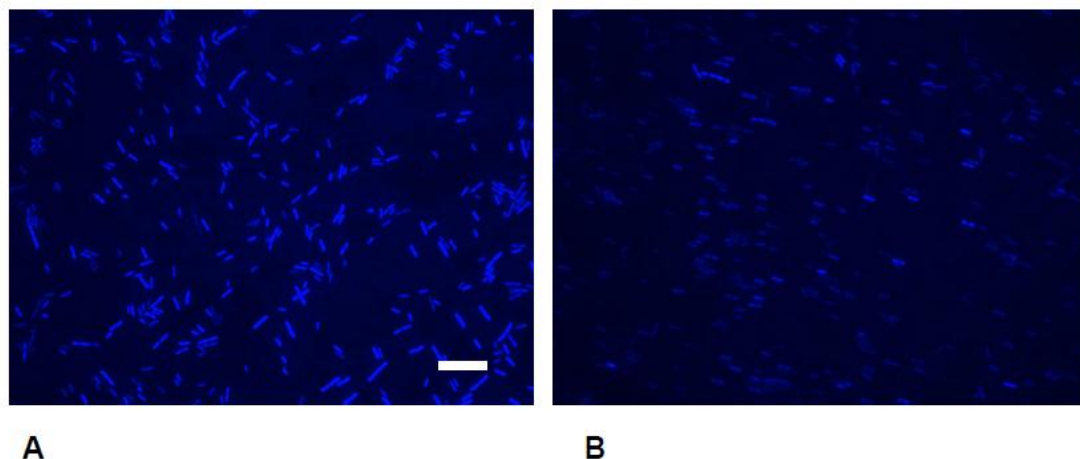


Figura 30. Las células de la estirpe productora de eDNA presentan una mayor intensidad de fluorescencia con una tinción de DAPI. Fotografías de células de un cultivo en MSgg de A) *B. subtilis* 3610 y B) mutante 3610 *oppA::mini-Tn10* durante el momento de máxima producción de eDNA. Las células están teñidas con $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de DAPI y resuspendidas en PBS pH 7,4. La barra representa $10 \mu\text{m}$.

Con el objetivo de cuantificar estas observaciones, y determinar si este fenómeno afecta a todas las células o a una subpoblación, empleamos la técnica de citometría de flujo.

Para ello, la estirpe silvestre y la estirpe defectiva *degU::mini-Tn10* (GP229) se crecieron en MSgg, se extrajeron muestras de células a diferentes tiempos, se fijaron y se tiñeron con DAPI. Por otra parte, se hizo una cuantificación del eDNA presente en el sobrenadante, para determinar el momento de máxima producción. Se analizó la intensidad de fluorescencia de DAPI de 20.000 células en cada una de las muestras, y se compararon entre la estirpe silvestre y el mutante. La distribución del tamaño celular de las dos poblaciones es similar y la distribución de la intensidad de fluorescencia de DAPI dentro de la población no está asociada a un tamaño de célula particular, sino que se distribuye de forma homogénea como se puede observar en el gráfico de densidad (intensidad de DAPI vs tamaño celular, FSC-H) (Fig. 31).

Para realizar un análisis comparativo y cuantitativo de los datos de citometría de flujo, determinamos la intensidad media de DAPI de la población de *B. subtilis* con los datos de intensidad de fluorescencia del mutante no productor durante la fase estacionaria

RESULTADOS

(7 horas). Denominamos “alta intensidad de DAPI” a aquellas que son superiores a la intensidad media. Hemos observado una diferencia significativa en el porcentaje de células con alta intensidad de DAPI entre la estirpe silvestre y el mutante, entre las cinco y las seis horas de crecimiento, lo que se corresponde con el inicio de la producción de eDNA (Fig. 32). Esta diferencia en el porcentaje de DAPI se observa al final de la fase de crecimiento exponencial, cuando las células ya no se replican activamente. Estos resultados apuntan a que solamente una subpoblación de células en la estirpe productora de eDNA, las que presentan “alta intensidad de DAPI”), tienen una alta tasa de replicación previa al momento de máxima concentración de eDNA en el medio. Este grupo de células con “alta intensidad de DAPI”, se encuentra en un número reducido en la estirpe no productora.

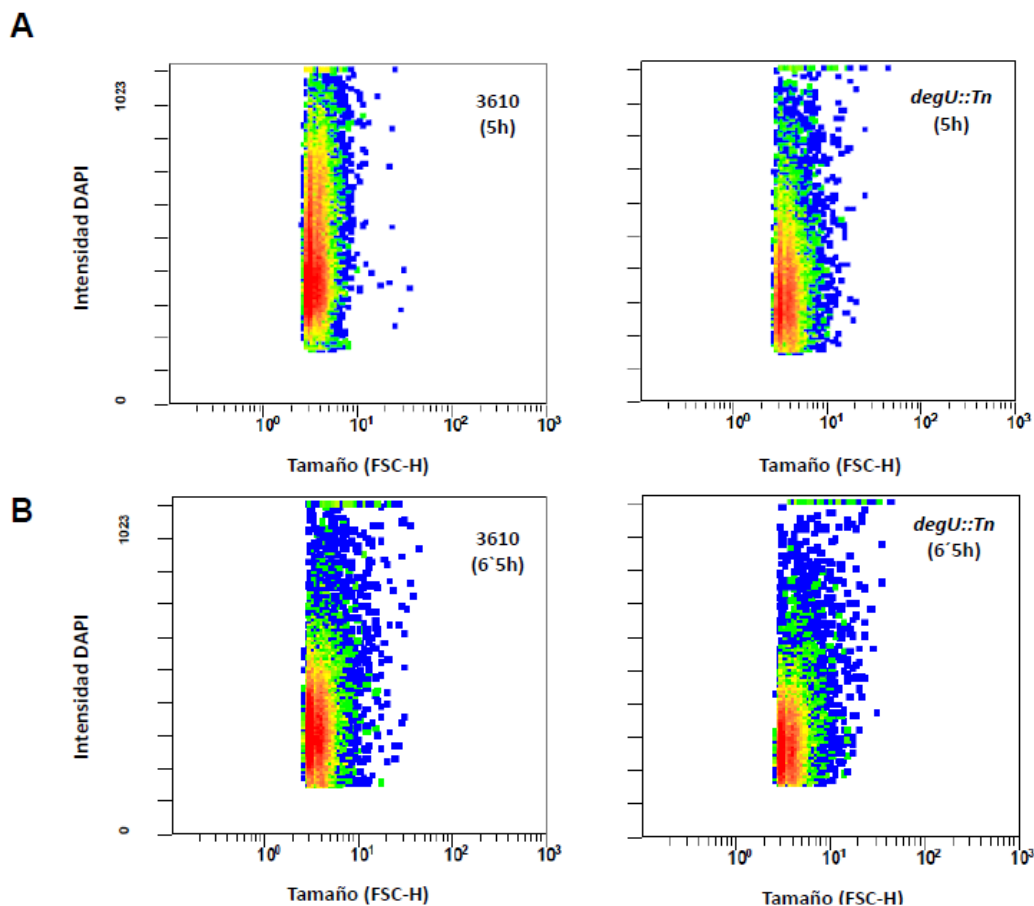


Figura 31. Citometría de flujo, gráficos de densidad. Distribución de la intensidad de DAPI respecto al tamaño celular (FSC-H) de cultivos de la estirpe silvestre y el mutante 3610 *degU::mini-Tn10*. El número de células está representado por colores (en rojo: mayor número y en azul: menor número) A) Muestras tomadas a las 5 h de crecimiento. B) Muestras tomadas a las 6,5 h de crecimiento.

RESULTADOS

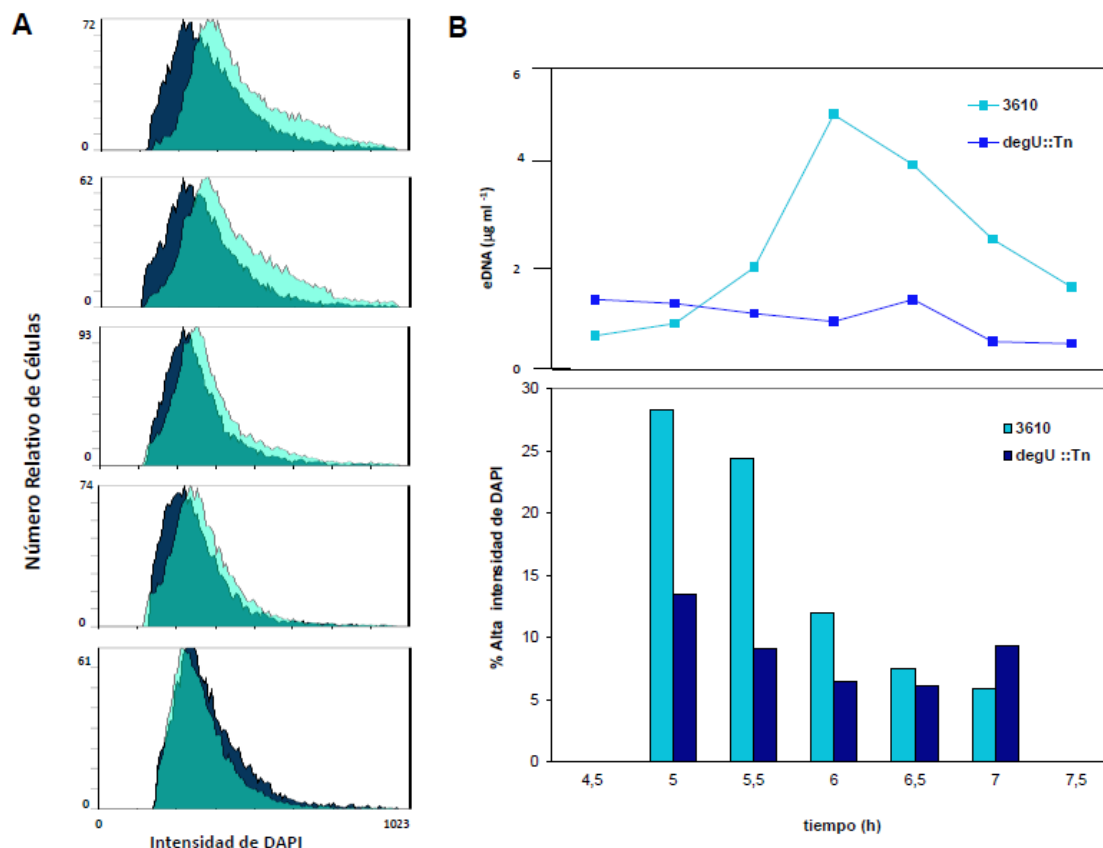


Figura 32. Análisis de citometría de flujo. A) Gráficos de la distribución de intensidad de fluorescencia de DAPI en células de la estirpe silvestre 3610 (verde claro) y 3610 *degU*::mini Tn10 (GP229) (azul oscuro) a distintos tiempos del cultivo. B) La gráfica superior representa la producción de eDNA en 3610 y 3610 *degU*::mini-Tn10 (GP229), se muestra un experimento representativo. eDNA indica la concentración de DNA en el sobrenadante del cultivo en MSgg ($\mu\text{g ml}^{-1}$). En las gráfica inferior, las barras muestran el porcentaje de células con intensidad de DAPI superior a la media en *B. subtilis* 3610 y 3610 *degU*::mini-Tn10.

6. Estudio de la función del eDNA en poblaciones naturales de *B. subtilis*

En poblaciones de *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch y cols; 2002 and Allesen-Holm y cols; 2006) y *Bacillus cereus* (Vilain y cols; 2009) se ha observado que el eDNA tiene una función relevante en la formación de biofilms, contribuyendo a la cohesión de las células durante los primeros estadios de su formación. Con el objetivo de comprobar la existencia de una relación entre la producción de eDNA en *B. subtilis* con este fenómeno, hemos estudiado la formación de biofilms de estirpes defectivas en

RESULTADOS

producción de eDNA. Para ello, se crecieron en MSgg la estirpe silvestre 3610, el mutante extendido 3610 SPR, el mutante *oppA::mini-Tn10* (GP233), y la estirpe de laboratorio PY79 (control negativo que produce biofilms menos robustos que los de la estirpe 3610) durante 40 horas a 30 °C sin agitación. Se observó tal como se esperaba, una diferencia significativa en el grosor entre biofilms producidos por 3610 y PY79, en cambio, el mutante extendido y el mutante *oppA::mini-Tn10* producen biofilms tan robustos como 3610 (Fig. 33). Por tanto, el eDNA no interviene en la formación de biofilms en *B. subtilis*.

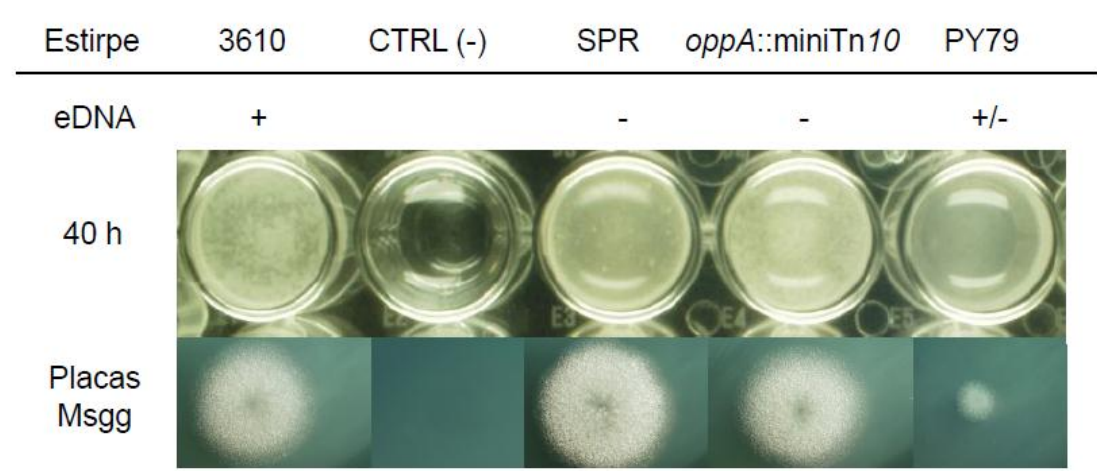


Figura 33. Efecto de la producción de eDNA durante la formación de biofilms en varias estirpes de *B. subtilis*. Se analizó la formación de biofilms en medio MSgg líquido y sólido de las estirpes 3610, 3610 SPR (GP305), 3610 *oppA::mini-Tn10* (GP233) y PY79, incubando las muestras a 30°C sin agitación (o a 37°C en placa). El biofilm en medio líquido se visualiza como una película en la parte superior del medio. El control negativo consiste en un cultivo de MSgg sin inocular.

Por otro lado, como ya se ha descrito previamente, se han identificado mutaciones en genes de competencia que provocan una reducción en la producción de eDNA, lo que apunta a una conexión entre ambos fenómenos y a una posible función del eDNA en mecanismos de transferencia génica horizontal. Hemos encontrado evidencias en este sentido al observar que la adquisición de la competencia y la producción de eDNA se solapan en el tiempo durante el crecimiento (Fig.34). Además, hemos determinado que los mutantes defectivos identificados en este trabajo están afectados en competencia, lo que es esperable para las mutaciones en genes de competencia

RESULTADOS

(*oppA*, *oppF*, *comP* y *degU*) pero se observa este efecto también en los mutantes 3610 SPR (GP305), 3610 *topA*::mini-Tn10 y el mutante 3610 *yqhG*::mini-Tn10 cuyas mutaciones *a priori* no están relacionadas con fenómenos de competencia (Fig. 34).

Para determinar si *B. subtilis* puede ser transformado con el eDNA, se incubó la estirpe competente PY79 con sobrenadante de bacterias productoras y no productoras de

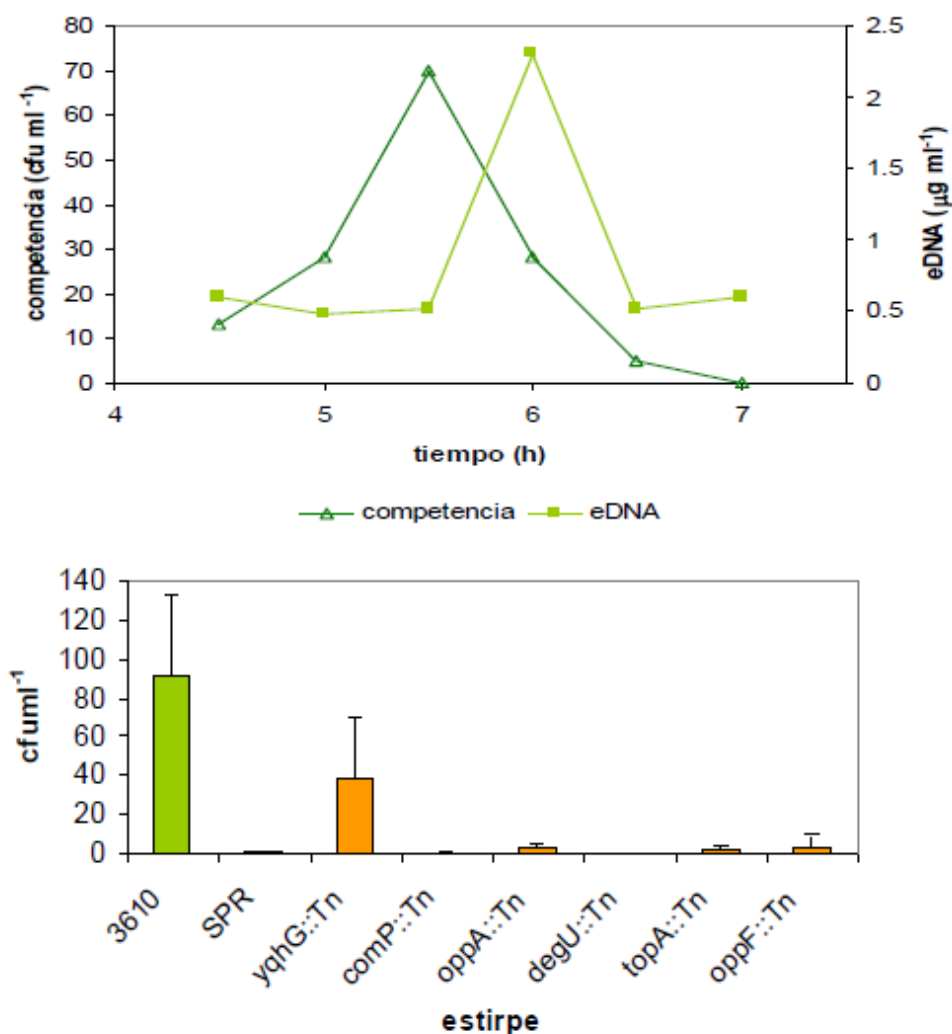


Figura 34. Relación de los fenómenos de competencia y la producción de eDNA en *B. subtilis*. En la parte superior se representa el desarrollo de la competencia (cfu ml⁻¹) y producción de eDNA durante el crecimiento de *B. subtilis* 3610 en MSgg. En la parte inferior, ensayos de la competencia (cfu ml⁻¹) de la estirpe *B. subtilis* 3610 y de las distintas estirpes afectadas en la producción de eDNA al ser transformadas con 10 μg de genómico en MSgg. Ambos experimentos se han repetido al menos tres veces.

RESULTADOS

eDNA durante el punto máximo de producción, y se mide la frecuencia de transformación. Los sobrenadantes provienen de estirpes que presentan marcadores de resistencia a antibióticos para su selección tras la transformación: 3610 *amyE::Pfeu-lacZ* (EG385) (estirpe silvestre productora de eDNA con resistencia a antibiótico), 3610 *degU::mini-Tn10* (GP229) (estirpe mutante deficiente en la producción de eDNA), y 3610 *skfABCDEF::tet sdpABC::erm* (GP315) (estirpe defectiva en canibalismo pero productora de eDNA, que se utiliza como control de lisis generada mediante canibalismo durante los primeros estadios de la esporulación). Para evitar la interferencia de esporas y contaminación celular se filtra el sobrenadante previamente a la transformación. Se midió la frecuencia de transformación del eDNA de los sobrenadantes, y se observó que solamente se obtienen transformantes al incubar con sobrenadante de estirpes productoras, y la frecuencia de transformación es similar para el silvestre y el mutante de canibalismo (Fig. 35), de lo que se deduce que el eDNA producido en la fase estacionaria, puede ser usado para compartir información genética dentro de la población durante fenómenos de transferencia génica horizontal, y esta producción no está relacionada con procesos de lisis.

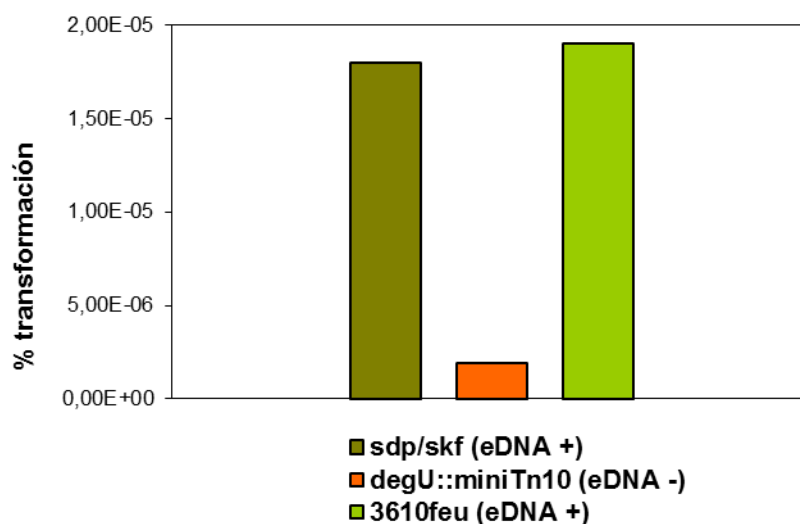


Figura 35. . Análisis de la transformabilidad del eDNA en *B. subtilis*. Transformación de sobrenadantes de *B. subtilis* 3610 *skfABCDEF::tet sdpABC::erm* (GP315), 3610 *degU::mini Tn10* (GP229) y 3610 *amyE::Pfeu-lacZ* (EG385) durante el tiempo de máxima producción de eDNA. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos realizados.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. **La estirpe no domesticada *B. subtilis* 3610 secreta todo su cromosoma mediante un mecanismo independiente de lisis**

Hemos identificado que la estirpe natural 3610 secreta fragmentos de DNA de doble cadena al medio, cuya longitud varía entre 200 pb a más de 10 kb. La producción de eDNA presenta una concentración máxima durante la fase exponencial tardía que oscila entre 2 y 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, seguido de un drástico descenso al comienzo de la fase estacionaria (Fig. 11). Pese a que existe una desviación en la concentración de eDNA entre experimentos independientes, que también se ha observado en otros microorganismos (Allensen-Holm y cols; 2006), la producción de eDNA en 3610 es significativamente reproducible y claramente asociada a la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. La comparación del genoma de *B. subtilis* y el eDNA mediante microarrays, ha permitido identificar que el eDNA se corresponde con todo el genoma (Fig. 13). La secreción de todo el cromosoma se ha observado en otras bacterias como en *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *P. putida* (Vilain y cols; 2009; Qin y cols; 2007; Steinberg y Holden; 2005). Por otro lado, en *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa* se observó que la producción de eDNA es máxima al final de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria, cuando se alcanza la mayor densidad celular, seguido de un inmediato descenso de la presencia de eDNA (Moscoso y cols 2004; Allensen-Holm y cols; 2006), de forma similar a lo que hemos observado en la estirpe 3610. En otros casos como en *N. gonorrhoeae* y *E. faecalis* la producción de eDNA se produce tanto en la fase exponencial como en estacionaria, estando la producción de eDNA temprana no asociada a lisis y la tardía sí (Hamilton y cols; 2005; Barnes y cols; 2012), indicando un proceso de regulación diferente al de *B. subtilis*. Nuestro trabajo confirma que el rápido descenso de la concentración de eDNA en el sobrenadante tras el máximo punto de producción no es debido a la presencia de DNasas en el sobrenadante, aunque no se puede descartar la presencia de DNasas asociadas a la membrana celular (Fig. 15). La secuencia de algunas moléculas de eDNA no presenta divergencias significativas con respecto a los respectivos fragmentos del genoma de *B. subtilis*, lo que indica que la síntesis de eDNA se produce mediante el mecanismo habitual de replicación de la célula.

DISCUSIÓN

En contraste, este patrón de producción de eDNA no se ha podido reproducir en la estirpe domesticada *B. subtilis* PY79, siendo su producción variable y no específica de ninguna fase de crecimiento (Fig. 12). Por otro lado, en la estirpe *B. subtilis* 168 se ha detectado una producción de eDNA muy inferior durante la fase exponencial y estacionaria (Lorenz y cols; 1991). Nuestro estudio apoya nuevamente que el empleo de cepas de laboratorio puede enmascarar determinados fenotipos, y que efectivamente las cepas no domesticadas son un mejor modelo para el estudio de comportamientos sociales como se ha demostrado en *B. subtilis* (Branda y cols; 2001; Kearns y cols; 2004).

Los principales mecanismos descritos de producción de eDNA están relacionados con lisis (Thomas y cols; 2009; Qin y cols; 2007) o con un transporte activo (Hamilton y cols; 2005). Nuestros datos apuntan a la existencia de un mecanismo activo de secreción en *B. subtilis*, ya que mediante distintos abordajes experimentales no se ha podido detectar un proceso de lisis celular que explique las elevadas concentración de eDNA presentes en los sobrenadantes de cultivos de *B. subtilis* 3610. La actividad β -galactosidasa en estos sobrenadantes no resultó significativa, lo que contrasta con lo observado mediante el mismo ensayo en cultivos de *P.aeruginosa* y *S. pneumoniae*, que permitió demostrar que la producción de eDNA en estos microorganismos es debida a lisis celular (Allensen-Holm y cols; 2006; Steinmoen y cols; 2003) (Fig. 16). Por otra parte, tanto el conteo de viables como la proporción de células vivas respecto a muertas en un cultivo de *B. subtilis* descartan que exista un proceso de lisis, incluso durante el punto máximo de producción de eDNA (Fig. 17). Por otro lado, se construyeron mutantes de los genes que codifican para las lisinas mayoritarias de *B. subtilis* (*lytA*, *B*, *C* y *E*), así como, de genes responsables de otros procesos de lisis, como el que ocurre durante el fenómeno de canibalismo (*sdp* y *skf*), y se observó que la producción de EDNA de estos mutantes no está afectada. Por último, los genes *xkdG*, *M* y *K* que codifican para proteínas de origen viral, se ha demostrado que están involucrados en la producción de eDNA de *B. subtilis* 168 mediante lisis (Shingaki y cols; 2003). Por ello, se construyó el mutante 3610 *xkdG* y se observó que la producción de eDNA no estaba afectada (Fig. 18). Por lo tanto, ningún mecanismo de lisis conocido en *B. subtilis* está relacionado con la liberación de eDNA al medio. En

DISCUSIÓN

otras dos bacterias se ha observado que la producción de eDNA no está asociada a lisis, en *N. gonorrhoeae*, donde se ha identificado un sistema de secreción de tipo IV implicado en este fenómeno (Dillard y Seifert; 2001; Hamilton y cols; 2001; Hamilton y cols; 2005) y en *E. faecalis*, en la que se ha descartado un proceso de lisis mediante estudios de microscopía, pero no se ha descubierto el mecanismo de transporte (Bernes y cols, 2012). La existencia de un mecanismo de secreción de eDNA activo y coordinado en *B. subtilis* supone un comportamiento social en la población que no se había descrito previamente y cuya función debe ser importante en las comunidades formadas por esta bacteria.

2. Genes implicados en competencia y metabolismo de DNA intervienen en la producción de eDNA

La identificación de una mutación espontánea que induce la pérdida de la producción de eDNA y produce un fenotipo de morfología extendida, nos ha servido como herramienta para realizar una búsqueda visual de mutantes incapaces de producir eDNA empleando una biblioteca de mutantes de transposición. Mediante esta metodología identificamos mutantes afectados en competencia, metabolismo de DNA y uno en un gen de función desconocida. Entre los genes relacionados en la ruta de competencia están *oppA*, *oppF*, *comP*, *comX*, *degU* (Tabla 5). El 50% de las inserciones que se identificaron se localizan en el gen *oppA*, por lo que la oligopéptido permeasa (Opp) parece ser importante para este fenómeno, aunque se descarta como transportador del DNA porque el tamaño de poro de este sistema no es suficiente para transportar polímeros de DNA de doble cadena (Lazzazera y cols; 2001; Salomon y cols 2003), por lo que su función debe estar relacionada con el sistema de señalización que induce la producción de eDNA. Por otro lado, identificamos mutaciones en genes implicados en metabolismo de DNA, como *mfd* que está relacionado con la reparación de DNA (Ayora y cols; 1996; Zalieckas y cols; 1998) y *topA* que codifica para una DNA topoisomerasa (Meima y cols; 1998). La implicación de estos genes en la producción de DNA puede explicar la alta tasa de replicación que se observa en células productoras de eDNA mediante los análisis de citometría. Es posible que existan otros genes implicados en la replicación de DNA necesarios para la producción de eDNA, pero su mutación podría ser deletérea y por tanto esta metodología no permitiría

DISCUSIÓN

identificarlos. Finalmente, hemos identificado el gen *yqhG*, de función desconocida, cuya relación con la producción de DNA será investigada en el futuro. Esta aproximación experimental para la búsqueda de mutantes afectados en producción de eDNA tiene una limitación, ya que sólo hemos identificado aquellos genes mutados que tienen una morfología extendida, pero podrían existir, aunque no tenemos evidencia de ello, otros genes implicados pero no afectados en la morfología de colonia. Por otra parte, esta búsqueda no nos ha permitido identificar el transportador implicado en la secreción del eDNA. Una mutación en este transportador podría no afectar a la morfología de la colonia o bien podría tener un efecto letal debido a la acumulación de DNA intracelular.

Estos resultados nos han permitido identificar una relación entre la ruta de competencia y de genes relacionados con el metabolismo de DNA con la producción de eDNA. Este es el primer trabajo en el que se demuestra en *B. subtilis* que genes de competencia temprana están implicados en la producción de eDNA, ya que en un estudio previo en esta bacteria se observó la existencia de un solapamiento de ambos procesos pero no se aportaron pruebas moleculares de esta relación (Lorenz y cols; 1991). En la bibliografía reciente, sólo se ha identificado la implicación de genes de competencia en la producción de eDNA en la bacteria Gram positiva *S. pneumoniae*, relacionándose la inducción de la producción de eDNA con los genes *comA* y *comC*, ambos implicados en la síntesis y transporte de CSP (péptido estimulador de la competencia) (Moscoso y Claverys, 2004). Por otro lado, en la bacteria *B. cereus* se ha identificado que genes implicados en la síntesis de ácidos nucleicos son esenciales para la producción de eDNA y, como en el caso de *B. subtilis*, no existen mecanismos de lisis implicados (Vilain y cols; 2009), por lo que puede ser común para el género *Bacillus* la producción de DNA asociada a una mayor síntesis de ácidos nucleicos y mediante un transportador que facilite la exportación del DNA.

El análisis de la expresión génica del mutante 3610 SPR mediante microarrays nos ha permitido realizar una caracterización inicial de este mutante desconocido, aunque su relación con la producción de eDNA o qué genes inducen la morfología extendida siguen siendo desconocidos. Hemos observado que la expresión génica del mutante

DISCUSIÓN

SPR presenta un patrón similar al mutante 3610 *degU::mini-Tn10*, presentando un 40% de coincidencia en la expresión de los genes de ambos mutantes (Fig. 24). Por otro lado, hemos observado que uno de los efectos mayoritarios de la mutación SPR en la estirpe 3610 es la inhibición de la síntesis de proteínas ribosomales, aunque la relación de este fenotipo con la producción de eDNA no parece clara. De estos resultados podemos concluir que existe un patrón de expresión similar entre el mutante 3610 *degU::mini-Tn10* y 3610 SPR, mientras que el del mutante *oppA::mini-Tn10* es un patrón completamente diferente al de los otros dos mutantes.

3. ***La ruta de regulación de la producción de eDNA se inicia mediante señales de quorum sensing y genes de competencia temprana***

En este trabajo hemos descubierto que el sistema de regulación de la competencia temprana está implicado también en la producción de eDNA, mientras que las proteínas que codifican el sistema para importar DNA durante el proceso de competencia (genes de competencia tardía) no están involucrados en la producción de eDNA en *B. subtilis*. Hemos determinado que la disrupción de cada uno de los genes que codifican para los péptidos PhrC (también denominado CSF), PhrK, PhrF y PhrG produce una disminución significativa de la liberación de eDNA al medio en 3610 (Fig. 25). Estudios previos han identificado que estos péptidos estimulan la expresión de genes dependientes de ComA y que todos son requeridos para la correcta actividad de ComA (Autchung y cols; 2006; Bongiorno y cols; 2005). Además, el péptido PhrG favorece la actividad del factor de transcripción DegU (Ogura y cols; 2003). Estos resultados apuntan a que la oligopéptido permeasa Opp estaría involucrada en la producción de eDNA a través de los péptidos PhrC, PhrK y PhrF que favorecen la actividad del regulador ComA, y de PhrG que activa el factor de transcripción DegU. Por lo tanto, señales de *quorum sensing* indican a las bacterias productoras el momento en el que deben secretar el eDNA e iniciar la ruta de competencia, mediante los factores de transcripción ComA y DegU. Este comportamiento ya se ha descrito en otros microorganismos donde las señales de *quorum sensing* inducen la producción de eDNA como por ejemplo en *S. aureus*, *P. aeruginosa* o *S. pneumoniae* (Qin y cols; 2007; Allensen-Holm y cols; 2006; Steinmoen y cols; 2003). Se ha propuesto que la producción de eDNA en *S. pneumoniae* estaría bajo la regulación de señales de *quorum*

DISCUSIÓN

sensing para la identificación de células receptoras de genes potenciales en las proximidades, inhibiéndose la competencia si no existe el suficiente número de bacterias del mismo ferogrupo (Steinmoen y cols; 2003).

El sistema de transporte de oligopéptidos Opp y el sistema de señalización ComP-X están involucrados en la producción de eDNA y ambos convergen en la activación mediante fosforilación de ComA, el principal regulador de la competencia temprana, y de hecho, un mutante en *comA* no tiene la capacidad de producir eDNA (Fig. 26). Un aspecto interesante en la regulación de la producción de eDNA es la cuestión de si *comS* está implicado. Este gen se ubica dentro del gen *srfAB*, en un marco abierto de lectura distinto. El gen *srfAB* es el segundo gen del operon *srfA* responsable de la producción del antibiótico surfactina, y su producto regula la activación de los genes de competencia tardía (D'Souza y cols; 1994). Hemos observado que una mutación en *srfAA*, el primer gen del operon *srfA*, afecta a la liberación de eDNA. Una posibilidad es que este efecto se debiera a un efecto polar de esta mutación sobre la transcripción de *comS* (D'Souza y cols; 1994) y no a la ausencia de surfactina. De hecho, hemos descartado una implicación directa de la surfactina en la producción de eDNA y en la morfología extendida debido a que los mutantes *phrC*, *oppA::mini-Tn10*, *degU::mini-Tn10* y SPR no tienen afectada la producción de la surfactina (Fig. 27), de lo que se deduce que *comS* podría desempeñar una función en la regulación de la producción de eDNA. ComS controla la expresión de ComK, impidiendo su degradación mediante el complejo proteolítico MecA/ClpCP (Turgay y cols; 1998). Por otro lado, se ha visto que este complejo también puede degradar *in vitro* la forma fosforilada de DegU (Ogura y cols; 2010). Por ello, proponemos que, de forma alternativa, ComS podría impedir la degradación de DegU, que como hemos observado es esencial para la producción de eDNA.

La ruta que regula la producción de eDNA deja de converger con la competencia en el regulador de competencia tardía ComK. Un mutante *comK* no está afectado en la producción de eDNA y ocurre igualmente con los genes *comEA* y *comGA*, que codifican para el sistema de importación del DNA durante la competencia, por lo que

DISCUSIÓN

además se descarta que este sistema de transporte pudiera ser utilizado para liberar el DNA al exterior.

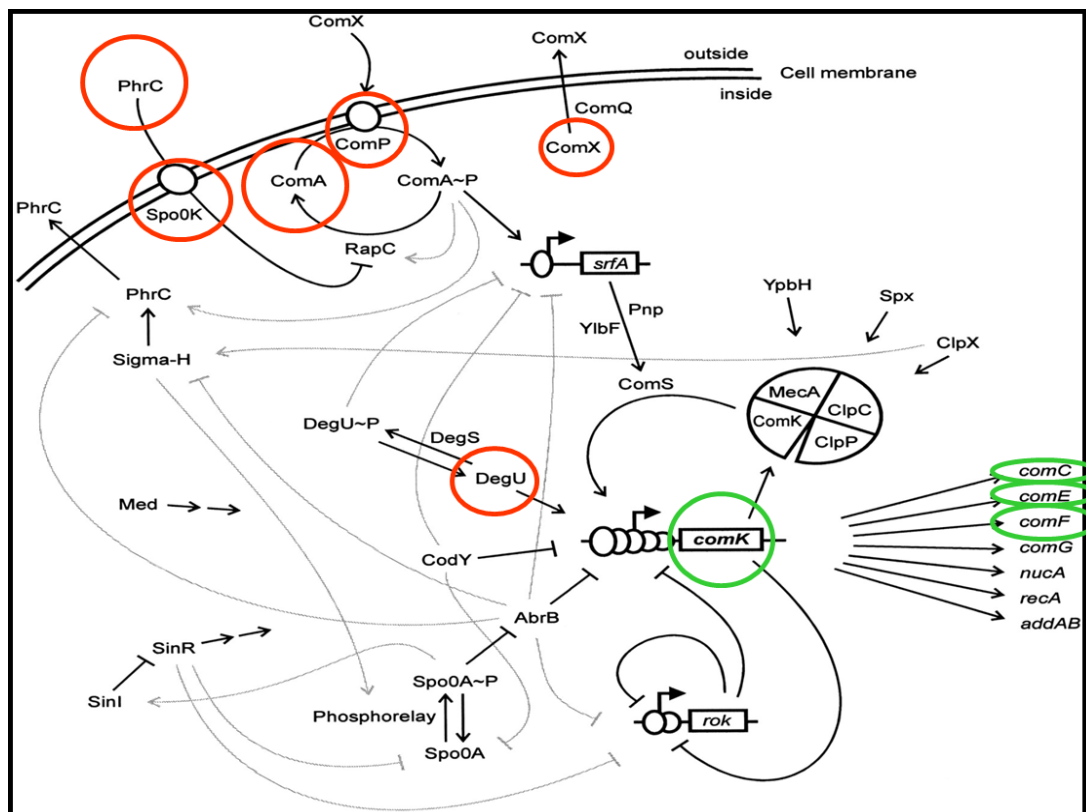


Figura 36. Regulación de la competencia en *B. subtilis*, adaptado de Hamoen y cols; 2002. Se resaltan en rojo las proteínas relacionadas con la producción de eDNA identificadas en este estudio. En verde se resaltan proteínas que intervienen en la síntesis del sistema de transporte de DNA al interior de la célula, pero que no están relacionados con la producción de eDNA.

En conclusión, señales de *quorum sensing* controlan la entrada en competencia y genes de la ruta de competencia temprana pero no de la fase tardía, regulan la producción de eDNA.

4. *Relación entre motilidad y producción de eDNA*

El perfil transcripcional del mutante 3610 *degU::mini-Tn10* nos muestra que durante la producción de eDNA se están sobreexpresando un 64% de genes implicados en

DISCUSIÓN

motilidad. Por tanto, DegU en ese momento se debe encontrar en un estado parcialmente fosforilado que es responsable de la expresión de genes de síntesis de flagelo y motilidad (Kobayashi; 2007, Verhamme y cols; 2007). En este estudio hemos demostrado que la disrupción de los genes de motilidad *sigD* y *hag*, producen un defecto en la liberación de eDNA al medio (Fig. 29). Estudios previos han demostrado que ComK inhibe indirectamente la expresión de *sigD* a través de FlgM, y se ha propuesto la existencia de un interruptor molecular que induce un cambio en la expresión de las células que gobiernan la decisión de inducir la motilidad o la competencia (Liu y Zuber; 1998). Pese a que nosotros proponemos que ComS regula la producción de eDNA, debe existir una señal alternativa de inhibición de ComK que se activa en las células que producen eDNA y se produzca la expresión de σ^D y Hag, de hecho mutaciones en *comK* y en la maquinaria de importación del eDNA no reduce la secreción de eDNA (Fig. 28). Por otro lado, se ha identificado mediante análisis de amplificación cuantitativa de mRNA de *hag*, que existe un pico de la expresión a las 6 h en medio mínimo, tras lo cual desciende su expresión drásticamente, lo que coincide con el pico máximo de secreción de eDNA detectado en nuestro laboratorio (Mirel y cols; 2000).

5. *Producción de eDNA por una subpoblación de células*

Nuestros resultados determinaron que la estirpe natural 3610 secreta al medio todo su cromosoma y que no existen mecanismos de lisis involucrados en dicha producción, lo que implica la existencia de una mayor tasa de replicación que pueda mantener la correcta división celular y la producción de altas cantidades de eDNA. Nuestros experimentos apoyan esta hipótesis, ensayos preliminares de microscopía apuntaban a la existencia de células con mayor tinción del DNA con DAPI en poblaciones productoras de eDNA en comparación con mutantes no productores (Fig. 30). En la misma línea, los experimentos de citometría de flujo identificaron la existencia de una población de células con un mayor contenido de DNA que el mutante no productor en los tiempos previos al punto máximo de eDNA. Tras la producción, la cantidad de DNA se vuelve nuevamente similar entre las dos estirpes. Estos resultados apuntan a que las células encargadas de la producción de eDNA suponen un 10-15 % de la población y que efectivamente se necesita una mayor tasa de replicación en estas células que

DISCUSIÓN

expliquen el mayor contenido de DNA (Fig. 32). En otros microorganismos también se ha identificado la existencia de una subpoblación de células que produce eDNA, como en *P. aeruginosa* donde se encontraron evidencias de que la población productora de eDNA en las biopelículas son las células con movilidad (Allensen-Holm y cols; 2006). En *S. pneumoniae* se determinó que la subpoblación de células competentes induce la producción de lisinas, y la lisis de las células no competentes mediante contacto directo célula-célula produce la liberación de eDNA (Steinmoen y cols; 2003). En biopelículas de *E. faecalis* las células con mayor tasa de metabolismo son las que producen eDNA mediante un mecanismo independiente de lisis (Bernes y cols; 2012). La liberación de eDNA al medio mediante una subpoblación también se ha observado en *S. aureus* (Qin y cols; 2007) y *C. crescentus* (Berne y cols; 2010). Por lo tanto, la producción de eDNA por parte de una subpoblación de células parece ser un comportamiento generalizado en las estirpes estudiadas y parece que tiene sentido considerando el elevado coste metabólico de la replicación, por lo que sería razonable que existiera una división celular del trabajo respecto a la producción de eDNA.

6. **Modelo de regulación de la producción de eDNA en *B. subtilis* 3610**

Nuestros resultados apuntan a que la liberación de eDNA está regulada a través de DegU parcialmente fosforilado, estado que induce la expresión de genes de motilidad incluyendo *hag* y *sigD*, y que favorece la existencia de una población de células móviles en detrimento de la aparición de células que produzcan exopolisacáridos para formar comunidades multicelulares y de células competentes. Por otro lado, proponemos que, para la producción de eDNA, es necesario la acumulación de señales de *quorum sensing*, concretamente los péptidos Phr, que van a inducir la activación de ComA y DegU. Finalmente, esta ruta activa ComS, que bloquea la proteasa MecA/ClpCp, implicada en la degradación de ComK y además de DegU, por lo que ComS además podría impedir la degradación no sólo de ComK sino de DegU (Fig. 37). Nuestros resultados implican que la población productora de eDNA podría ser la constituida por células móviles que no tiene activada la síntesis de la maquinaria de competencia. Otro aspecto que apoya nuestra hipótesis, es que ComK bloquea la replicación de eDNA en *B. subtilis* durante la competencia (Hahn y cols; 1995) y como hemos demostrado

DISCUSIÓN

mediante citometría las células productoras de eDNA tienen mayor cantidad de eDNA en su interior y por lo tanto su replicación de eDNA debe estar inducida.

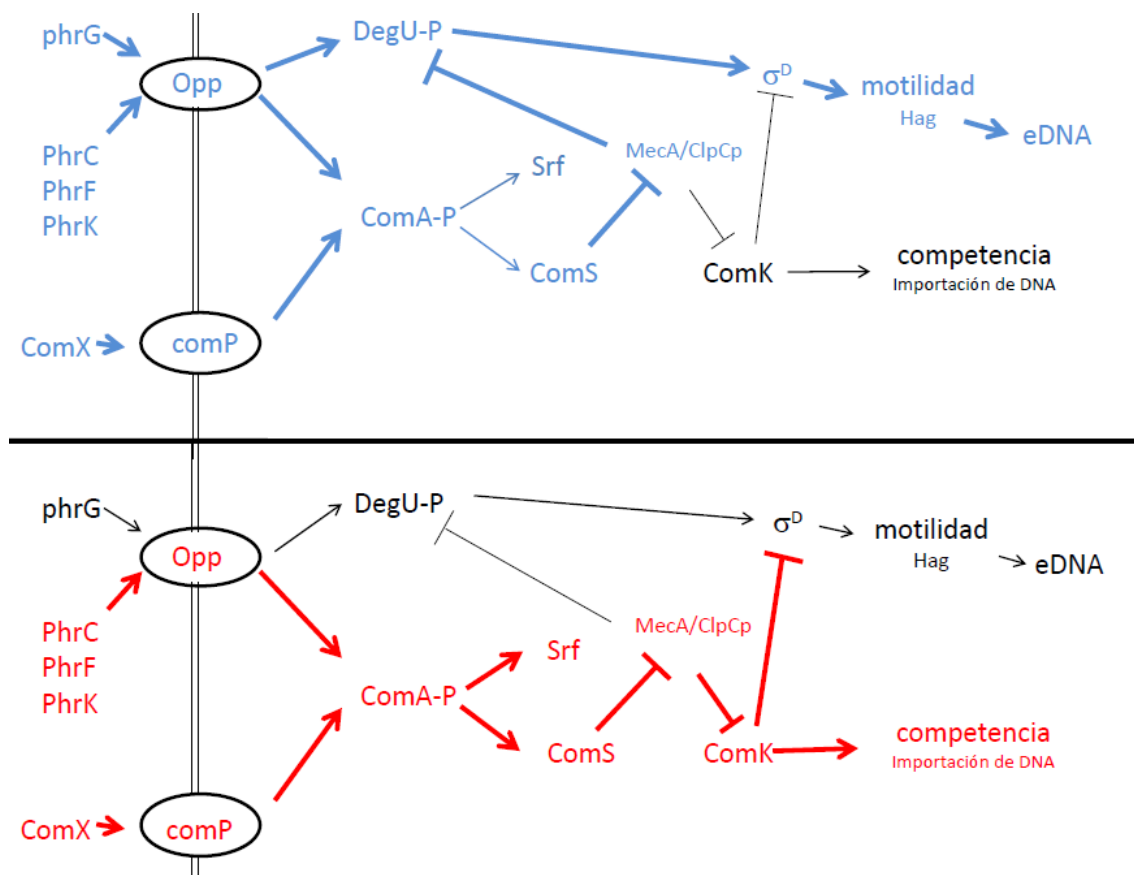


Figura 37. Posible ruta de regulación que gobierna la secreción de eDNA en *B. subtilis* 3610. En la parte superior, se destaca en azul la posible vía que se activa en las células productoras de eDNA. En la parte inferior se destaca en rojo la vía que se activa en las células competentes.

7. Función del eDNA en transferencia génica horizontal

En muchos microorganismos se ha comprobado que el eDNA tiene un papel fundamental en la formación y establecimiento de las biopelículas (Whitchurch y cols; 2002; Allensen-Holm y cols; 2006; Carrolo y cols; 2010; Mollin y Tolker-Nielsen; 2003). En el caso de *B. subtilis*, la producción de eDNA no es esencial para la formación de biopelículas, ya que los mutantes afectados en la producción de eDNA, 3610 SPR y 3610 *oppA::mini-Tn10*, forman biopelículas robustas similares a las de la estirpe

DISCUSIÓN

silvestre. Nuestros resultados apoyan que la función del eDNA en *B. subtilis* está relacionada con la transferencia génica horizontal. Por un lado, hemos observado que los fenómenos de competencia y la producción de eDNA en la población se desarrollan próximos en el tiempo, por lo que existe suficiente eDNA en el medio para que pueda ser captado por las células competentes. Además, hemos determinado que la producción de eDNA está vinculada con la regulación de las etapas iniciales de la competencia, y muchos de los mutantes afectados en la producción de eDNA identificados en este estudio, como 3610 SPR, 3610 *yqhG::mini-Tn10* o 3610 *oppA::mini-Tn10*, tienen disminuida también la competencia, lo que pone de manifiesto una estrecha relación entre ambas rutas. Por último, hemos comprobado que el eDNA producido por 3610 se puede utilizar en la transferencia génica, ya que el eDNA de sobrenadantes de esta estirpe ha sido empleado con éxito para transformar otra cepa de *B. subtilis*. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la función del eDNA en transferencia génica en *B. subtilis*, lo que además justifica que exista una regulación conjunta de ambos procesos. Esta conexión se ha observado en otros microorganismos como *N. gonorrhoeae* o *S. pneumoniae* (Hamilton y cols; 2005; Steinmoen y cols; 2002). La producción de eDNA podría ser parte de un mecanismo de generación de biodiversidad dentro de la población a través de la transferencia génica horizontal, aunque no se puede excluir una función adicional del eDNA como molde para la reparación del DNA genómico (Michod y cols; 1988; Wojcieclowski y cols; 1989).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La estirpe “no domesticada” *B. subtilis* 3610 secreta al medio copias de su genoma, al final de la fase exponencial, en forma de fragmentos de doble cadena de longitud variable.
2. Esta producción no está asociada a mecanismos de lisis, por lo que proponemos la existencia de un transporte activo implicado en la liberación de eDNA al medio.
3. Hemos identificado mutaciones en genes implicados en *quorum sensing* (*phrC*, *phrF*, *phrK*, *phrG*), competencia temprana (*oppA*, *oppF*, *comP*, *comX*, *degU*, *comA* y *srfAA*) y metabolismo de DNA (*mfd* y *topA*) que afectan a la producción de eDNA. Por otro lado, el sistema de importación del DNA durante la competencia tardía no está implicado en la secreción de eDNA.
4. Mutaciones en los genes que controlan la expresión de la motilidad *sigD* y *hag* impiden la secreción de eDNA.
5. Se ha identificado una población de células que tienen mayor cantidad de DNA en su interior, mediante citometría de flujo, y que no está presente en la población de los mutantes defectivos en producción de eDNA. Proponemos que la población de productores de eDNA no coincide con la población de células competentes que expresan el sistema de importación de DNA.
6. La regulación conjunta de los procesos de competencia y producción de eDNA, su coincidencia en el tiempo y que se puedan transformar células de *B. subtilis* con el mismo, indican que la principal función del eDNA reside en la transferencia génica horizontal. Por otra parte, nuestros resultados descartan que el eDNA intervenga en la formación de biopelículas en *B. subtilis*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2006). "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms." *Mol Microbiol* **59**(4): 1114-1128.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-3402.
- Arnosti, D. N. and Chamberlin M. J. (1989). "Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(3): 830-834.
- Auchtung, J. M. Lee C.A., Grossman A.D. (2006). "Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides." *J Bacteriol* **188**(14): 5273-5285.
- Avery, S. V. (2005). "Cell individuality: the bistability of competence development." *Trends Microbiol* **13**(10): 459-462.
- Ayora, S., Rojo F., Ogasawara N., Nakai S., Alonso J.C. (1996). "The Mfd protein of *Bacillus subtilis* 168 is involved in both transcription-coupled DNA repair and DNA recombination." *J Mol Biol* **256**(2): 301-318
- Barilla, D., Caramori T., Galizzi A. (1994). "Coupling of flagellin gene transcription to flagellar assembly in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **176**(15): 4558-4564.
- Barnes, A. M., Ballering K.S., Leibman R.S., Wells C.L., Dunny G.M. (2012). "Enterococcus faecalis produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation." *MBio* **3**(4): e00193-00112.
- Battista, J. R. (1997). "Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*." *Annu Rev Microbiol* **51**: 203-224.
- Bauche, C. and J. Laval (1999). "Repair of oxidized bases in the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*." *J Bacteriol* **181**(1): 262-269.
- Berne, C., Kysela D.T., Brun Y.V. (2010). "A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm." *Mol Microbiol*.
- Bongiorno, C., Ishikawa S., Stephenson S., Ogasawara N., Perego M. (2005). "Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems." *J Bacteriol* **187**(13): 4353-4361.
- Borenstein, S. and E. Ephrati-Elizur (1969). "Spontaneous release of DNA in sequential genetic order by *Bacillus subtilis*." *J Mol Biol* **45**(1): 137-152.
- Branda, S. S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11621-11626.
- Britton, R. A., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossman, A.D. (2002). "Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **184**(17): 4881-4890.
- Burkholder, P. R. and N. H. Giles, Jr. (1947). "Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*." *Am J Bot* **34**(6): 345-348.

BIBLIOGRAFÍA

- Burrell, A. D., et al. (1971). "DNA-membrane association and the repair of double breaks in x-irradiated *Micrococcus radiodurans*." *Biochim Biophys Acta* **247**(1): 38-53.
- Carrolo, M., Frias M.J., Pinto F.R., Melo-Cristino J., Ramirez M. (2010). "Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*." *PLoS One* **5**(12): e15678.
- Catlin, B. W. (1960). "Transformation of *Neisseria meningitidis* by deoxyribonucleates from cells and from culture slime." *J Bacteriol* **79**: 579-590.
- Cosby, W. M., Vollenbroich D., Lee O.H., Zuber P. (1998). "Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control." *J Bacteriol* **180**(6): 1438-1445.
- Costerton, J. W. Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. y Lappin-Scott, H. M. (1995). "Overview of microbial biofilms." *J Ind Microbiol* **15**(3): 137-140.
- Crabb, W. D., Streips, U.N., Doyle, R.J. (1977). "Selective enrichment for genetic markers in DNA released by competent cultures of *Bacillus subtilis*." *Mol Gen Genet* **155**(2): 179-183.
- Chai, Y., Chu F., Kolter R., Losick R. (2008). "Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **67**(2): 254-263.
- Chen, I. and D. Dubnau (2003). "DNA transport during transformation." *Front Biosci* **8**: s544-556.
- Chung, J. D., Stephanopoulos G., Ireton K., Grossman A.D. (1994). "Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation." *J Bacteriol* **176**(7): 1977-1984.
- Chung, Y. S. and Dubnau D. (1998). "All seven *comG* open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **180**(1): 41-45.
- Danner, D. B., Deich R.A., Sisco K.L., Smith H.O. (1980). "An eleven-base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation." *Gene* **11**(3-4): 311-318.
- Dillard, J. P. and Seifert H. S. (2001). "A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates." *Mol Microbiol* **41**(1): 263-277.
- Dorward, D. W., Garon C.F., Judd R.C. (1989). "Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*." *J Bacteriol* **171**(5): 2499-2505.
- Draghi, J. A. and Turner P. E. (2006). "DNA secretion and gene-level selection in bacteria." *Microbiology* **152**: 2683-2688.
- D'Souza, C., Nakano M.M., Zuber P. (1994). "Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9397-9401.
- Dubnau, D. (1991). "Genetic competence in *Bacillus subtilis*." *Microbiol Rev* **55**(3): 395-424.
- Dubnau, D. (1999). "DNA uptake in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **53**: 217-244.

BIBLIOGRAFÍA

- Earl, A. M., et al. (2008). "Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*." *Trends Microbiol* **16**(6): 269-275.
- Eisen, M. B. and Brown P. O. (1999). "DNA arrays for analysis of gene expression." *Methods Enzymol* **303**: 179-205.
- Finkel, S. E. and Kolter R. (2001). "DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs." *J Bacteriol* **183**(21): 6288-6293.
- Freese, E. (1972). "Sporulation of bacilli, a model of cellular differentiation." *Curr Top Dev Biol* **7**: 85-124.
- Freese, E., Heinze J.E., Galliers E.M. (1979). "Partial purine deprivation causes sporulation of *Bacillus subtilis* in the presence of excess ammonia, glucose and phosphate." *J Gen Microbiol* **115**(1): 193-205.
- Fujita, M., González-Pastor J.E., Losick R. (2005). "High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **187**(4): 1357-1368.
- Givskov, M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S. (1996). "Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling." *J Bacteriol* **178**(22): 6618-6622.
- Gonzalez-Pastor, J. E. (2011). "Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiol Rev* **35**(3): 415-424.
- Gonzalez-Pastor, J. E., Hobbs E.C., Losick R. (2003). "Cannibalism by sporulating bacteria." *Science* **301**(5632): 510-513.
- Goodman, S. D. and Scocca J. J. (1988). "Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6982-6986.
- Guerout-Fleury, A. M., Shazand K., Frandsen N., Stragier P. (1995). "Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*." *Gene* **167**(1-2): 335-336.
- Hahn, J., Bylund J., Haines M., Higgins M., Dubnau D. (1995). "Inactivation of *mecA* prevents recovery from the competent state and interferes with cell division and the partitioning of nucleoids in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **18**(4): 755-767.
- Hahn, J., Kong L., Dubnau D. (1994). "The regulation of competence transcription factor synthesis constitutes a critical control point in the regulation of competence in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **176**(18): 5753-5761.
- Haijema, B. J., van Sinderen D., Winterling K., Kooistra J., Venema G., Hamoen L.W. (1996). "Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **22**(1): 75-85.
- Hamilton, H. L., Domínguez N.M., Schwartz K.J., Hackett K.T., Dillard J.P. (2005). "*Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system." *Mol Microbiol* **55**(6): 1704-1721.
- Hamilton, H. L., Schwartz K.J., Dillard J.P. (2001). "Insertion-duplication mutagenesis of *neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island." *J Bacteriol* **183**(16): 4718-4726.
- Hamoen, L. W., Van Werkhoven A.F., Venema G., Dubnau D. (2000). "The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9246-9251.

BIBLIOGRAFÍA

- Hamoen, L. W., Venema G., Kuipers O.P. (2003). "Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators." *Microbiology* **149**: 9-17.
- Hamze, K., Julkowska D., Autret S., Hinc K., Nagorska K., Sekowska A., Holland I.B., S  r S.J. (2009). "Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*." *Microbiology* **155**(Pt 2): 398-412.
- Harwood, C. R. and Cutting S. M. (eds.) (1990). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester, U.K., John Wiley and Sons.
- Havarstein, L. S., Coomaraswamy G., Morrison D.A. (1995). "An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11140-11144.
- Hayashi, K., Kensuke T., Kobayashi K., Ogasawara N., Ogura M. (2006). "*Bacillus subtilis* RghR (YvaN) represses *rapG* and *rapH*, which encode inhibitors of expression of the *srfA* operon." *Mol Microbiol* **59**(6): 1714-1729.
- Inamine, G. S. and Dubnau D. (1995). "ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport." *J Bacteriol* **177**(11): 3045-3051.
- Izano, E. A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. (2008). "Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Appl Environ Microbiol* **74**(2): 470-476.
- Jones, T. R., Carpenter A.E., Lamprecht M.R., Moffat J., Silver S.J., Grenier J.K., Castoreno A.B., Eggert U.S., Root D.E., Golland P., Sabatini D.M. (2009). "Scoring diverse cellular morphologies in image-based screens with iterative feedback and machine learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1826-1831.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge T. J. (1995). "Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion." *J Bacteriol* **177**(14): 3998-4008.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge T. J. (1996). "Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics." *J Bacteriol* **178**(10): 2767-2774.
- Kahn, M. E., (1982). "Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(20): 6370-6374.
- Kaplan, J. B., Izano E.A., Gopal P., Karwacki M.T., Kim S., Bose J.L., Bayles K.W., Horswill A.R. (2012). "Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." *MBio* **3**(4): e00198-00112.
- Karl, D. M. and Bailiff, M.D. (1989). "The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments." *Limnol. Oceanogr.* **34**: 543-558.
- Kearns, D. B., Chu F., Rudner R., Losick R. (2004). "Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility." *Mol Microbiol* **52**(2): 357-369.
- Kearns, D. B. and Losick R. (2003). "Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **49**(3): 581-590.

BIBLIOGRAFÍA

- Kearns, D. B. and Losick R. (2005). "Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*." *Genes Dev* **19**(24): 3083-3094.
- Kobayashi, K. (2007). "Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **66**(2): 395-409.
- Kreth, J., Vu H., Zhang Y., Herzberg M.C. (2009). "Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*." *J Bacteriol* **191**(20): 6281-6291.
- Kunst, F., Msadek T., Bignon J., Rapoport G. (1994). "The DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*." *Res Microbiol* **145**(5-6): 393-402.
- Kunst, F., Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Danchin A. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* **390**(6657): 249-256.
- Lanigan-Gerdes, S., Dooley A.N., Faull K.F., Lazazzera B.A. (2007). "Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **65**(5): 1321-1333.
- Lazazzera, B. A. (2001). "The intracellular function of extracellular signaling peptides." *Peptides* **22**(10): 1519-1527.
- Lazazzera, B. A., Solomon J.M., Grossman A.D. (1997). "An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*." *Cell* **89**(6): 917-925.
- LeDeaux, J. R. and Grossman A. D. (1995). "Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **177**(1): 166-175.
- LeDeaux, J. R., Solomon J.M., Grossman A.D. (1997). "Analysis of non-polar deletion mutations in the genes of the spo0K (opp) operon of *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiol Lett* **153**(1): 63-69.
- Lennon, J. T. (2007). "Diversity and metabolism of marine bacteria cultivated on dissolved DNA." *Appl Environ Microbiol* **73**(9): 2799-2805.
- Liu, J. and Zuber P. (1998). "A molecular switch controlling competence and motility: competence regulatory factors ComS, MecA, and ComK control sigmaD-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **180**(16): 4243-4251.
- Londono-Vallejo, J. A. and Dubnau D. (1994). "Membrane association and role in DNA uptake of the *Bacillus subtilis* PriA analogue ComF1." *Mol Microbiol* **13**(2): 197-205.
- Lopez, D. and Kolter R. (2010). "Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiol Rev* **34**(2): 134-149.
- Lopez, D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. (2009). "Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **74**(3): 609-618.

BIBLIOGRAFÍA

- Lorenz, M. G., Gerjets D., Wackernagel W. (1991). "Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria." *Arch Microbiol* **156**(4): 319-326.
- Lorenz, M. G. and Wackernagel W. (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." *Microbiol Rev* **58**(3): 563-602.
- Magnuson, R., Solomon J., Grossman A.D. (1994). "Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*." *Cell* **77**(2): 207-216.
- Mah, T. F. and O'Toole G. A. (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." *Trends Microbiol* **9**(1): 34-39.
- Margot, P., Pagni M., Karamata D. (1999). "Bacillus subtilis 168 gene *lytF* encodes a gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase expressed by the alternative vegetative sigma factor, sigmaD." *Microbiology* **145**: 57-65.
- Matsui, K., Ishii N., Kawabata Z. (2003). "Release of extracellular transformable plasmid DNA from *Escherichia coli* cocultivated with algae." *Appl Environ Microbiol* **69**(4): 2399-2404.
- Meima, R., Haan G.J., Venema G., Bron S., de Jong S. (1998). "Sequence specificity of illegitimate plasmid recombination in *Bacillus subtilis*: possible recognition sites for DNA topoisomerase I." *Nucleic Acids Res* **26**(10): 2366-2373.
- Michod, R. E., (1988). "DNA repair and the evolution of transformation in the bacterium *Bacillus subtilis*." *Genetics* **118**(1): 31-39.
- Mirel, D. B., Estacio W.F., Mathieu M., Olmsted E., Ramirez J., Márquez-Magaña L.M. (2000). "Environmental regulation of *Bacillus subtilis* sigma(D)-dependent gene expression." *J Bacteriol* **182**(11): 3055-3062.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen T. (2003). "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure." *Curr Opin Biotechnol* **14**(3): 255-261.
- Moscoso, M. and Claverys J. P. (2004). "Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA." *Mol Microbiol* **54**(3): 783-794.
- Moscoso, M., García E., López R. (2006). "Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion." *J Bacteriol* **188**(22): 7785-7795.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod L., Lewenza S. (2008). "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000213.
- Nakano, M. M., Hajarizadeh F., Zhu Y., Zuber P. (2001). "Loss-of-function mutations in *yjbD* result in ClpX- and ClpP-independent competence development of *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **42**(2): 383-394.
- Nemoto K. F., Hirota, K., Murakami K., Taniguti K., Murata H., Viducic D., Miyake Y. (2003). "Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*." *Chemotherapy* **49**(3): 121-125.
- Nielsen, K. M., Johnsen P.J., Bensasson D., Daffonchio D. (2007). "Release and persistence of extracellular DNA in the environment." *Environ Biosafety Res* **6**(1-2): 37-53.

BIBLIOGRAFÍA

- Ogram A., and, Barkay T. (1987). "The extraction and purification of microbial DNA from sediments." *J. Microbiol.Meth.* **7**: 57–66.
- Ogura, M., Shimane K., Asai K., Ogasawara N., Tanaka T. (2003). "Binding of response regulator DegU to the aprE promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **49**(6): 1685-1697.
- Ogura, M. and Tsukahara K. (2010). "Autoregulation of the *Bacillus subtilis* response regulator gene degU is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP." *Mol Microbiol* **75**(5): 1244-1259.
- Passador, L. and Linn T. (1997). "Mapping of sequences required for the translation of the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Can J Microbiol* **43**(9): 819-826.
- Paul, J. H., Jeffrey W.H., DeFlaun M.F. (1987). "Dynamics of extracellular DNA in the marine environment." *Appl Environ Microbiol* **53**(1): 170-179.
- Perego, M. and Brannigan J. A. (2001). "Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases." *Peptides* **22**(10): 1541-1547.
- Perego, M. and Hoch J. A. (1996). "Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems." *Trends Genet* **12**(3): 97-101.
- Pesci, E. C., Milbank J.B., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P., Iglewski B.H. (1999). "Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11229-11234.
- Petit, M. A., Bruand C., Janni  re L., Ehrlich S.D. (1990). "Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **172**(12): 6736-6740.
- Piggot, P. J. and Hilbert D. W. (2004). "Sporulation of *Bacillus subtilis*." *Curr Opin Microbiol* **7**(6): 579-586.
- Potter, J. L., Spector S., Matthews L.W., Lemm J. (1969). "Studies on pulmonary secretions. 3. The nucleic acids in whole pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy." *Am Rev Respir Dis* **99**(6): 909-916.
- Provvedi, R., Chen I., Dubnau D. (2001). "NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **40**(3): 634-644.
- Qin, Z., Ou Y., Yang L., Zhu Y., Tolker-Nielsen T., Molin S., Qu D. (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* **153**(Pt 7): 2083-2092.
- Renelli, M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. (2004). "DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential." *Microbiology* **150**(Pt 7): 2161-2169.
- Rimini, R., Jansson B., Feger G., Roberts T.C., de Francesco M., Gozzi A., Faggioni F., Domenici E., Wallace D.M., Frandsen N., Polissi A. (2000). "Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays." *Mol Microbiol* **36**(6): 1279-1292.
- Roggiani, M., Hahn J., Dubnau D. (1990). "Suppression of early competence mutations in *Bacillus subtilis* by mec mutations." *J Bacteriol* **172**(7): 4056-4063.

BIBLIOGRAFÍA

- Rudner, D. Z., LeDeaux J.R., Ireton K., Grossman A.D. (1991). "The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence." *J Bacteriol* **173**(4): 1388-1398.
- Sambrook, J. and Russell D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press.
- Schooling, S. R. and Beveridge T. J. (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." *J Bacteriol* **188**(16): 5945-5957.
- Schreiber, F., Beutler M., Enning D., Lamprecht-Grandio M., Zafra O., González-Pastor J.E., de Beer D. (2011). "The role of nitric-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: biofilm formation, swarming, and dispersal." *BMC Microbiol* **11**: 111.
- Shingaki, R., Kasahara Y., Inoue T., Kokeguchi S., Fukui K. (2003). "Chromosome DNA fragmentation and excretion caused by defective prophage gene expression in the early-exponential-phase culture of *Bacillus subtilis*." *Can J Microbiol* **49**(5): 313-325.
- Smith, N. H., Maynard Smith J., Spratt B.G. (1995). "Sequence evolution of the *porB* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: evidence of positive Darwinian selection." *Mol Biol Evol* **12**(3): 363-370.
- Smits, W. K., Eschevins C.C., Susanna K.A., Bron S., Kuipers O.P., Hamoen L.W. (2005). "Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development." *Mol Microbiol* **56**(3): 604-614.
- Solomon, J., Su L., Shyn S., Grossman A.D. (2003). "Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport." *J Bacteriol* **185**(21): 6425-6433.
- Solomon, J. M., Lazazzera B.A., Grossman A.D. (1996). "Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*." *Genes Dev* **10**(16): 2014-2024.
- Solomon, J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A.D. (1995). "Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*." *Genes Dev* **9**(5): 547-558.
- Sonenshein, A. L. (2002). "Developmental biology: regulation by selective gene localization." *Curr Biol* **12**(3): R90-92.
- Sparling, P. F. (1966). "Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance." *J Bacteriol* **92**(5): 1364-1371.
- Spizizen, J. (1958). "Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(10): 1072-1078.
- Spizizen, J. (1965). *Analysis of asporogenic mutants in Bacillus subtilis by genetic transformation*. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Srivatsan, A., Han Y., Peng J., Tehranchi A.K., Gibbs R., Wang J.D., Chen R. (2008). "High-precision, whole-genome sequencing of laboratory strains facilitates genetic studies." *PLoS Genet* **4**(8): e1000139.
- Steinberger, R. E. and Holden P. A. (2005). "Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms." *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 5404-5410.
- Steinmetz, M. and Richter R. (1994). "Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome." *J Bacteriol* **176**(6): 1761-1763.

BIBLIOGRAFÍA

- Steinmoen, H., Knutsen E., Håvarstein L.S. (2002). "Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7681-7686.
- Steinmoen, H., Teigen A., Håvarstein L.S. (2003). "Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation." *J Bacteriol* **185**(24): 7176-7183.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends Microbiol* **9**(5): 222-227.
- Tani, K. and Nasu M. (2010). Chapter 3: Roles of Extracellular DNA in Bacterial Ecosystem. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Thomas, V. C., Hiromasa Y., Harms N., Thurlow L., Tomich J., Hancock L.E. (2009). "A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*." *Mol Microbiol* **72**(4): 1022-1036.
- Turgay, K., Hahn J., Burghoorn J., Dubnau D. (1998). "Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor." *EMBO J* **17**(22): 6730-6738.
- Hara, T., and Ueda, S. (1981). "A Study on the Mechanism of DNA Excretion from *P. aeruginosa* KYU-1 -Effect of Mitomycin C on Extracellular DNA Production-." *Agric. Biol. Chem.* **45**(11): 2457-2461.
- van Sinderen, D., Luttinger A., Kong L., Dubnau D., Venema G, Hamoen L. (1995). "comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **15**(3): 455-462.
- van Sinderen, D. and Venema G. (1994). "comK acts as an autoregulatory control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **176**(18): 5762-5770.
- Verhamme, D. T., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R. (2007). "DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **65**(2): 554-568.
- Vilain, S., Pretorius J.M., Theron J., Brözel V.S. (2009). "DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms." *Appl Environ Microbiol* **75**(9): 2861-2868.
- Vuong, C., Gerke C., Somerville G.A., Fischer E.R., Otto M. (2003). "Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* **188**(5): 706-718.
- Wach, A. (1996). "PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*." *Yeast* **12**(3): 259-265.
- Weinrauch, Y., Penchev R., Dubnau E., Smith I., Dubnau D. (1990). "A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems." *Genes Dev* **4**(5): 860-872.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. (2002). "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." *Science* **295**(5559): 1487.

BIBLIOGRAFÍA

- White, O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., Dodson R.J, Haft D.H., Gwinn M.L., Nelson W.C., Richardson D.L., Moffat K.S., Qin H., Jiang L., Pamphile W., Crosby M., Shen M., Vamathevan J.J., Lam P., McDonald L., Utterback T., Zalewski C., Makarova K.S., Aravind L., Daly M.J., Minton K.W., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Nelson K.E., Salzberg S., Smith H.O., Venter J.C., Fraser C.M. (1999). "Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1." *Science* **286**(5444): 1571-1577.
- Wojciechowski, M. F., Hoelzer M.A., Michod R.E. (1989). "DNA repair and the evolution of transformation in *Bacillus subtilis*. II. Role of inducible repair." *Genetics* **121**(3): 411-422.
- Zalieckas, J. M., Wray L.V. Jr., Ferson A.E., Fisher S.H. (1998). "Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* hut and gnt operons." *Mol Microbiol* **27**(5): 1031-1038.

ANEXOS

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>fruR</i>	1	0,08	-3,02	Represor del operón de fructosa
<i>hisB, D</i>	2	<0,09	<-2,61	Metabolismo de la histidina
<i>infA</i>	1	0,04	-2,57	Iniciador de la traducción
<i>kipA, I, R</i>	3	<0,2	<-3,30	Operón kip que interviene en la esporulación
<i>pdhC</i>	1	0,08	-3,59	Piruvato deshidrogenasa
<i>rplD, E, N, P, R, V, X</i>	7	<0,11	<-2,50	Proteína ribosomal
<i>rpmD</i>	1	0,11	-2,88	Proteína ribosomal
<i>rpsC, N</i>	2	<0,06	<-2,57	Proteína ribosomal
<i>ybaE</i>	1	0,03	-2,51	Desconocida
<i>ybxA</i>	1	0,08	-2,63	Desconocida
<i>ycsF</i>	1	0,06	-3,05	Desconocida
<i>yocK</i>	1	0,04	-2,62	Desconocida

ANEXOS

<i>ypuA</i>	1	0.07	-3.92	Desconocida
-------------	---	------	-------	-------------

Tabla 6. Genes inhibidos en el mutante 3610 SPR durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) menor o igual a -2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante SPR en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes.

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>albF, G</i>	2	<0,1	>2,93	Producción de bacteriocina listérica
<i>alsS</i>	1	0,003	3,25	Acetolactato sintasa
<i>dppA, B, C, D, E</i>	5	<0,05	>3,31	Transportador de oligopéptido (competencia y esporulación)
<i>metS</i>	1	0,03	2,99	Metionil sintetasa
<i>pksB</i>	1	0,03	2,72	Síntesis de poliquétidos
<i>radA</i>	1	0,009	2,57	Homólogo a proteína de reparación de DNA
<i>rapA, B</i>	2	0,01	2,85	Fosfatasa inhibidora esporulación
<i>uvrB</i>	1	0,1	2,66	excínucleasa
<i>ydaF</i>	1	0,05	4,08	desconocida

ANEXOS

<i>ykfA, B</i>	2	<0,08	>2,66	Desconocida. Adyacente al operón <i>dpp</i>
<i>yngA</i>	1	0,04	2,56	desconocida
<i>yqxJ</i>	1	0,15	2,67	desconocida
<i>ytmO</i>	1	0,2	2,56	desconocida
<i>ytnM</i>	1	0,18	2,58	desconocida
<i>yufN</i>	1	0,04	3,18	desconocida
<i>yurO</i>	1	0,1	3,63	desconocida
<i>ywaA</i>	1	0,1	2,7	desconocida

Tabla 7. Genes inducidos en el mutante 3610 SPR durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) mayor o igual a 2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante 3610 SPR en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>cheA, B, C, D, V, Y</i>	6	<0,02	<-2,53	Modulador señales quimiotácticas
<i>Flg B, E, K, L, M</i>	5	<0,02	<-2,78	Proteínas del flagelo
<i>Flh A, B, F, P</i>	4	<0,01	<-2,63	Proteínas del flagelo

ANEXOS

<i>Fli D, E, I, K, L, M, Q, R, S, Y, Z</i>	11	<0,01	<-2,7	Proteínas del flagelo
<i>hag</i>	1	0.02	-3,33	Flagelina
<i>hemAT</i>	1	0,02	-2,91	Motilidad y Quimiotaxis
<i>lyt A, B, C, D, F</i>	5	<0,04	<-2,6	Autolisinas implicadas en motilidad
<i>mcp A, B</i>	2	<0,007	<-3,1	Receptor implicado en señales quimiotácticas
<i>Mot A, B</i>	2	< 0,01	<-2,5	Proteína del flagelo
<i>sigD</i>	1	0,014	-2,78	Factor sigma implicada en motilidad
<i>tlpA, B, C</i>	3	<0,018	<-2,5	Quimiotaxis y esporulación
<i>ylxF, G, H, L</i>	4	<0,006	<-2,85	Desconocida, similar a genes que codifican para proteínas del flagelo
<i>ycxC</i>	1	0,08	-2,54	Desconocida
<i>ydfQ</i>	1	0,006	-3,2	Desconocida
<i>yfmT</i>	1	0,002	-2,96	Desconocida
<i>yjcP</i>	1	0,05	-2,96	Desconocida
<i>yjfB</i>	1	0,1	-2,96	Desconocida
<i>ykaA</i>	1	0,04	-2, 97	Desconocida
<i>ykoW</i>	1	0,1	-2,63	Desconocida
<i>ykvJ, L</i>	2	0,03	<-3,05	Desconocida
<i>ylbI</i>	1	0,08	-2,57	Desconocida
<i>ycdA</i>	1	5,2 E ⁻⁰⁴	-5,39	Desconocida

ANEXOS

<i>yndJ</i>	1	0,07	-2,59	Desconocida
<i>yqaL</i>	1	0,06	-2,89	Desconocida
<i>yqcF</i>	1	0,1	-3,51	Desconocida
<i>yqxJ</i>	1	0,02	-2,55	Desconocida
<i>ysnE</i>	1	0,003	-2,72	Desconocida
<i>yuaB</i>	1	0,2	-3,21	Desconocida
<i>ywtD</i>	1	0,04	-2,58	Desconocida
<i>yvcB</i>	1	0,01	-6,97	Desconocida
<i>yviE</i>	1	0,002	-2,99	Desconocida
<i>yvyC, G</i>	2	<0,004	<-2,69	Desconocida
<i>yvzB</i>	1	0,01	-2,62	Desconocida
<i>ywqI</i>	1	0,002	-5,33	Desconocida
<i>yueB</i>	1	0,01	-3,06	Receptor del fago SPP1
<i>yukA, C</i>	2	<0,04	<-3,03	Desconocida

Tabla 8. Genes inhibidos en el mutante 3610 *degU::mini-Tn10* durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) menor o igual a 2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante *degU::mini-Tn10* en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>albA, C, E F, G</i>	5	<0,03	>2,97	Producción de bacteriocina listérica
<i>cydD</i>	1	0,006	4,09	Expresión citocromo BD
<i>dppB, C, D, E</i>	4	<0,02	>2,60	Transportador de oligopéptido (competencia y esporulación)
<i>gltP</i>	1	0,01	2,59	Permeasa de glicerol 3-fosfato
<i>kapD</i>	1	0,1	3,01	Inhibición de KinA durante la esporulación
<i>mtlD</i>	1	0,06	2,81	Deshidrogenasa de manitol 1-P
<i>nhaX</i>	1	0,1	3,12	Regulador de NahC
<i>ogt</i>	1	0,03	2,96	Modificación y reparación de DNA
<i>phrA</i>	1	0,02	2,57	Fosfatasa implicada en competencia
<i>pksB</i>	1	0,05	4,23	Síntesis de poliquétidos
<i>rapA, B</i>	2	0,01	3,74	Fosfatasa inhibidora esporulación
<i>sipV</i>	1	0,1	3,40	Peptidasa

ANEXOS

<i>spolIAA</i>	1	0,02	2,54	Anti factor sigma
<i>spsF</i>	1	0,01	3,43	Síntesis de polisacáridos de la cubierta de la espora
<i>srfAB</i>	1	0,03	2,50	Síntesis surfactina
<i>ydaP</i>	1	0,1	2,77	desconocida
<i>ydhK</i>	1	0,06	2,71	desconocida
<i>yhdN</i>	1	0,2	3,54	desconocida
<i>yisT</i>	1	0,02	2,77	desconocida
<i>yjdB</i>	1	0,2	2,71	desconocida
<i>yttP</i>	1	0,09	2,57	desconocida
<i>yukJ</i>	1	0,003	2,51	desconocida
<i>yurM</i>	1	0,09	2,50	desconocida
<i>yvkC</i>	1	0,08	2,84	desconocida
<i>ywcl</i>	1	0,04	2,85	desconocida

ANEXOS

<i>yxiA</i>	1	0,004	3,04	desconocida
<i>yfiT</i>	1	0,1	2,93	desconocida
<i>yhcS</i>	1	0,002	2,52	desconocida

Tabla 9. Genes inducidos en el mutante *degU::mini-Tn10* durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) mayor o igual a 2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante *degU::mini-Tn10* en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>argD</i>	1	0,2	-4,01	aminotransferasa N-acetilornitina
<i>azlD</i>	1	0,1	-2,88	Transporte de aminoácidos
<i>carA</i>	1	0,8	-2,77	carbamoyl-fosfato- arginina transferasa (subunidad A)
<i>cydC</i>	1	0,1	-3,31	Expresión citocromo BD
<i>licB</i>	1	0,7	-3,08	Sistema fosfotransfersa (PTS), inducible por liquenina
<i>nasA</i>	1	0,1	-2,71	Transporte nitrato

ANEXOS

<i>nhaC</i>	1	0,03	-6,29	Transporte de sodio
<i>oppA, B, D, E, F</i>	5	<0,1	<-3,50	Transporte de oligopéptidos involucrados en esporulación y competencia
<i>pucE</i>	1	0,1	-3,24	xantina oxidasa
<i>rocG</i>	1	0,09	-3,27	Glutamato deshidrogenasa
<i>sat</i>	1	0,2	-3,52	Metabolismo del sulfuro
<i>sunT</i>	1	0,2	-5,05	Transportador lantibiótico
<i>ydbA, J</i>	2	<0,06	<-3,83	Desconocida, similar a transportador ABC
<i>ydeA</i>	1	0,1	-2,65	Desconocida
<i>yomN</i>	1	0,02	-5,49	Desconocida
<i>yscB</i>	1	0,04	-2,53	Desconocida
<i>ytcP</i>	1	0,06	-2,57	Desconocida
<i>ytmL</i>	1	0,2	-2,77	Desconocida

ANEXOS

<i>yxeP</i>	1	0,07	-2,95	Desconocida
-------------	---	------	-------	-------------

Tabla 10. Genes inhibidos en mutante 3610 *oppA::mini-Tn10* durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) menor o igual a -2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante *oppA::mini-Tn10* en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes

Nombre	Nº de genes del mismo operón o de función relacionada	P. value	F.Change	Función
<i>ilvB</i>	1	0,2	3,26	Acetolactato sintasa

Tabla 11. Gen inducido por *oppA::mini-Tn10* durante la producción de eDNA en 3610. Se muestran genes que presentan una tasa de cambio (Fold Change) mayor o igual a 2,5. Se establece como fiabilidad de la muestra un P. value $\leq 0,2$. Se crece 3610 y el mutante *oppA::mini-Tn10* en MSgg y se extraen muestras para el microarray treinta minutos antes al máximo de eDNA. La tabla resume 3 experimentos independientes